



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

교육학석사 학위청구논문

초파리 *Phosphatidylserine*
Decarboxylase 유전자 돌연변이의
미토콘드리아 분절화와 기능 이상

Mitochondrial Fragmentation and Abnormal
Function of *Drosophila* Phosphatidylserine
decarboxylase Gene Mutation

2019년 8월

서울대학교 대학원

과학교육과 생물전공

이 계 훈

초파리 *Phosphatidylserine*
Decarboxylase 유전자 돌연변이의
미토콘드리아 분절화와 기능 이상

Mitochondrial Fragmentation and Abnormal
Function of *Drosophila Phosphatidylserine*
decarboxylase Gene Mutation

지도 교수 전 상 학

이 논문을 교육학석사 학위논문으로 제출함
2019년 6월

서울대학교 대학원
과학교육과 생물전공
이 계 훈

이계훈의 교육학석사 학위논문을 인준함
2019년 7월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

초 록

미토콘드리아의 기능 이상과 그에 따른 ROS의 발생은 퇴행성 신경 질환을 일으키는 원인 중 하나이다. 미토콘드리아는 변화하는 생리적 환경에서 기능을 수행하고 유지하기 위해 끊임없이 fusion하고 fission하며 이러한 형태의 변화는 미토콘드리아의 기능을 유지하는데 중요하다. 하지만 미토콘드리아의 dynamics와 인지질 합성 유전자의 관계에 대한 연구가 부족하다. 우리는 Phosphatidylethanolamine (PE)가 막의 fusion을 위한 환경을 조성한다는 사실에 주목하여, 인지질 합성 유전자 *phosphatidylserine decarboxylase (Psd)*가 미토콘드리아의 dynamics에 미치는 영향에 대해 알아보고자 하였다. *Psd* 유전자의 돌연변이는 노화함에 따라 비행 근육의 미토콘드리아가 fragmentation되어 spherical shape를 보이고, 미토콘드리아 matrix 면적이 감소한다. 그리고 근육의 미토콘드리아 membrane potential이 mid-life 시기부터 감소하고 ROS가 증가한다. 또한 교세포 특이적 *Psd* 유전자 돌연변이 초파리는 신경퇴행성 표현형을 보인다. 본 연구를 통해 *Psd* 유전자의 기능 손실은 노화에 따른 미토콘드리아 구조와 기능 이상, 그리고 신경 퇴행을 야기함을 확인하였다. 결론적으로, *Psd* 유전자의 기능은 미토콘드리아 homeostasis와 신경계 유지에 중요하다고 할 수 있다.

주요어: 미토콘드리아, 포스파티딜 에탄올아민, 미토콘드리아 막 융합,
포스파티딜세린 디카르복실레이즈

학 번: 2017-27741

목 차

제 1 장 서론.....	1
1.1 신경퇴행성질환과 미토콘드리아	1
1.2 미토콘드리아 역동성	2
1.3 미토콘드리아와 인지질	4
1.4 PE합성과 Phosphatidylserine decarboxylase	6
1.5 연구목표	7
제 2 장 실험방법 및 실험재료.....	11
2.1 사용한 초파리	11
2.2 수명측정	11
2.3 climbing assay	11
2.4 뇌 조직 단면의 관찰	12
2.5 미토콘드리아와 근섬유의 항체 염색	14
2.6 DHE를 이용한 활성산소(ROS)의 측정	15
2.7 미토콘드리아의 막 전위 측정	15
제 3 장 결 과.....	18
3.1 <i>Psd</i> 유전자의 돌연변이는 신경퇴행성 표현형을 보였다....	18
3.2 <i>Psd</i> 유전자의 돌연변이 초파리는 미토콘드리아가 분절된 형태를 보였다	25
3.3 <i>Psd</i> 돌연변이 미토콘드리아는 막 전위가 감소했다.	31
3.4 <i>Psd</i> 돌연변이는 ROS가 증가하였다.	35

제 4 장 고찰.....	41
참고문헌	46
Abstract.....	51

표 목차

[표 1] 현재 알려져 있는 미토콘드리아 융합/분열을 조절하는 유전자의 돌연변이 표현형	30
---	----

그림 목차

[그림 1] PE의 구조와 세포막의 융합과정 모식도	9
[그림 2] PE 합성 경로 모식도.....	10
[그림 3] 초파리 비행 근육의 모식도,구조와 항체 염색사진	17
[그림 4] 교세포의 <i>Ps</i> d 유전자 돌연변이에서 나타나는 평균 수명의 감소	21
[그림 5] 교세포의 <i>Ps</i> d 유전자 돌연변이에서 나타나는 운동 능력의 감소	22
[그림 6] 교세포의 <i>Ps</i> d 유전자 돌연변이에서 나타나는 뇌 조직의 소실.....	23
[그림 7] 교세포의 <i>Ps</i> d 유전자 돌연변이에서 나타나는 ROS level의 증가.....	24
[그림 8] <i>Ps</i> d 돌연변이에서 나타나는 미토콘드리아 모양의 변화.....	27
[그림 9] <i>Ps</i> d 돌연변이 미토콘드리아 형태의 정량화	29
[그림 10] <i>Ps</i> d 유전자 돌연변이에서 나타나는 미토콘드리아 막 전위 ($\Delta\psi$)의 감소.....	33
[그림 11] <i>Ps</i> d 유전자 돌연변이에서 나타나는 ROS level의 증가.....	37
[그림 12] 미토콘드리아의 형태 및 기능에 대한 PE 합성 경로의 영향을 보여주는 모식도.....	39

제1장 서론

1.1. 신경퇴행성질환과 미토콘드리아

미토콘드리아의 기능 이상은 신경 퇴행, 당뇨, 심장병, 비만, 노화 등 여러 질환의 원인으로 주목받고 있다. 미토콘드리아는 세포 활동에 필요한 에너지를 생산하고 칼슘 저장 및 칼슘 신호 전달을 조절하며, 여러가지 채내 metabolite를 합성하고 분해하기 때문에 제대로 기능을 수행하는 미토콘드리아가 잘 유지되지 못하면 세포는 심각한 병리적 상태에 이르게 된다. 미토콘드리아의 기능과 조절 현상을 잘 이해하는 것은 우리가 겪고 있는 여러 질병들을 이해하고 나아가 치료하는 데에 중요할 것이다.

최근 신경퇴행성질환의 원인으로 미토콘드리아가 주목받고 있다. 대표적인 신경퇴행성질환으로 헌팅턴 병, 알츠하이머, 파킨슨병, 루게릭병 등이 있는데 이 질환의 공통적인 현상으로 미토콘드리아의 이상이 보고 되고 있다(Johri & Beal, 2012). 선행연구에 따르면 에너지 합성의 장애와 그에 따른 에너지의 결핍(Beal, 2005), 미토콘드리아 내막에 존재하는 전자전달계 효소의 활성 저하(Bosetti et al., 2002)가 알츠하이머 환자의 뇌 조직에서 발견되었다. 기능을 잃은 미토콘드리아를 제거하는 mitophagy가 제대로 일어나지 못하는 것은 파킨슨병의 발병과 관련이 있다(Narendra & Youle, 2011). 미토콘드리아의 기능 이상뿐만 아니라 형태와 구조의 이상 또한 퇴행성 신경질환과 연관된다. 미토콘드리아의 수, 크기의 감소와 형태의 변화가 헌팅턴 질환 환자에서 관찰된다(Kim et al., 2010). 또한 뉴런의 액손과 수상돌기에 미토콘드리아가 제대로 분포하지 못하는 현상도

신경퇴행모델동물 연구에서 관찰된 바 있다(Johri et al., 2012). 많은 연구에서도 알 수 있듯이 미토콘드리아의 구조와 기능의 이상은 많은 신경 퇴행 질환과 연관되어 있다(Bertholet et al., 2016). 세포에서 일어나는 물질 대사에 필요한 대부분의 에너지를 미토콘드리아가 합성한다는 사실은 미토콘드리아가 세포의 기능 유지에 얼마나 중요한지 짐작하게 해준다. 또한 신경계는 특히나 에너지를 많이 필요로 하기 때문에(Tzameli, 2012), 신경계를 이루는 세포는 미토콘드리아 기능 이상에 취약할 것이라는 관점은(Lezi & Swerdlow, 2012) 신경퇴행의 발병과 미토콘드리아 이상이 서로 연관되어 있는 이유를 잘 설명해준다.

1.2. 미토콘드리아의 역동성

미토콘드리아는 세포의 생리학적 상태에 따라 계속해서 분열(fission)을 하거나 융합(fusion)한다(Westermann, 2010). 이러한 미토콘드리아의 역동성(dynamics)은 미토콘드리아가 제대로 기능하고 건강하게 유지(quality control)하는데 필요한 수단이다. 미토콘드리아는 기능을 잃은 일부분을 제거하기 위해 분열을 통해서 일부를 따로 떼어 둔다(fission). 개별적인 미토콘드리아는 막에 의해 쌓이며 리소좀에 의해 분해되어, 그 분해 산물은 다시 세포를 위해 쓰이게 된다. 현재 위치로부터 먼 곳으로 미토콘드리아가 이동하여 적합한 분포를 가지기 위해서 미토콘드리아는 융합한 형태보다 면적이 작은 분열 형태를 채택한다. 또한 미토콘드리아는 분열된 상태에서 세포 사멸을 유도하는 cytochrome C를 방출한다(Westermann, 2010). 거대한 미토콘드리아보다 작은 형태의 미토콘드리아가 세포가 미토콘드리아를 제어하는 데 수월한 형태일 것이다. 분열이 미토콘드리아의 quality를 유지하는 전략이라면, 융합은 미토콘드리아가 효율적으로 기능하도록

하는 전략이다(Skulachev, 2001). 미토콘드리아는 융합을 하여 서로 연결된 형태의 네트워크를 형성한다. 즉 미토콘드리아의 내막과 외막 그리고 매트릭스를 공유한다. 융합의 이점은 바로 이 ‘공유’에 있다. 미토콘드리아는 유전물질과 유전물질을 합성하고 유지하고 수선하는데 필요한 단백질들을 공유하여 유전물질의 소실과 돌연변이 빈도를 낮춘다(Chen et al., 2010; Nakada et al., 2001). 유전물질 뿐만 아니라 전자전달계 효소를 공유하여 에너지 합성의 효율을 높이기도 한다(Skulachev, 2001). 또한 미토콘드리아가 기능하는데 중요한 막 전위(membrane potential, $\Delta\psi$)는 융합된 형태에서 미토콘드리아 전체로 전달될 수 있다. 이를 통해 막전위를 유지시킨다(Skulachev, 2001). 융합이 일어나지 못하면 결국 미토콘드리아 DNA의 소실과 전자전달계의 비활성, 막전위의 감소 등이 일어나 미토콘드리아가 기능을 잃어버리고 세포는 생존하기 어렵게 된다(Chen et al., 2010; Chen et al., 2005). 다시 말하면 미토콘드리아들이 서로 모여서 기능성을 유지하고, 효율을 높이는데 필요한 요소들을 공유하는 것이다. 융합과 분열은 모두 필수적이며 구별되는 기능을 발휘하므로, 융합과 분열이 적절하게 조절하는 것이 미토콘드리아의 기능과 유지에 중요하다. 미토콘드리아의 융합과 분열을 직접적으로 조절하고 수행하는 융합/분열 단백질들이 활발하게 연구되고 있다(Westermann, 2010). 미토콘드리아는 내막과 외막으로 이루어져 있어서 각각 외막과 내막의 역동성을 조절하는 효소 단백질이 존재한다. 외막의 융합에 필요한 Marf 유전자와 내막의 융합에 필요한 Opa1 유전자 그리고 분열에 관여하는 Drp1 유전자에 대한 연구가 활발히 이뤄지고 있다(Frohman, 2015). 이들은 모두 dynamin-like GTPase라는 공통점을 지닌다. 미토콘드리아의 융합/분열 단백질에 대한 연구가 잘 이뤄지고 있는

반면에, 미토콘드리아의 역동성과 관련된 인지질의 연구는 아직 부족하다 (Frohman, 2015). 단백질은 실제로 융합과 분열을 실질적으로 일으키는 핵심적인 요소이지만, 세포막을 구성하는 인지질은 단순히 막을 구성하고 경계 짓는 기능으로서 인식되어 왔기 때문에 연구가 부족하였다. 하지만 인지질이 단순히 세포막을 구성하는 것 이상으로 세포막 단백질의 활성화에 영향을 주고, 신호전달물질로서 기능을 하며, 막을 통한 물질 이동, 막의 유동성에 영향을 주는 등 그 중요성이 인식됨에 따라 미토콘드리아의 융합과 분열과정에서도 인지질의 조성이 영향을 준다는 것이 밝혀지고 있다(Osman et al., 2011; Jouhet, 2013; Frohman, 2015). 다시 말해 특정 인지질들이 융합이나 분열을 촉진하거나 억제하는 특성이 있다는 것이다. 이와 더불어 막을 갖는 세포 소기관들의 인지질 구성 비율은 일정하게 유지된다는 사실(Osman et al., 2011; van Meer & de Kroon, 2011)은 인지질 조성의 항상성을 융합/분열의 조절과 관련 지어 고민하게끔 해준다.

1.3. 미토콘드리아와 인지질

미토콘드리아의 내막과 외막은 Phosphatidylcholine (PC), Phosphatidylethanolamine (PE), Phosphatidylinositol (PI), Cardiolipin (CL) 등 다양한 인지질로 구성되어 있다. 이중에서 PE는 두번째로 가장 많이 존재하며(Horvath & Daum, 2013), PE는 다른 세포소기관들과 달리 미토콘드리아에 많이 존재한다는 것은 흥미로우며 하며, PE가 미토콘드리아에서 중요한 역할을 할 것이라는 예상을 하게한다(Osman et al., 2011; van Meer & de Kroon, 2011). 핵막, 소포체, 골지체, 미토콘드리아 등의 세포 소기관의 인지질 조성은 서로 다르며(van Meer & de Kroon, 2011) 이는 세포소기관의 독특한 인지질

조성 비율과 세포소기관의 기능이 관련이 있음을 암시한다. 다른 세포 소기관들과 마찬가지로 미토콘드리아의 인지질 조성은 일정하게 유지되며, 이러한 인지질 조성의 변화는 퇴행성 신경질환과 관련이 있다 (Kosicek & Hecimovic, 2013; Li, Zhang, & Sun, 2015). 따라서 미토콘드리아의 막을 통한 기능과 막을 조성하는 인지질의 특성을 연관짓는 것이 중요할 것이다.

인지질의 구조는 작용기를 갖는 ‘머리’와 아실기 (Acly group)를 갖는 ‘꼬리’로 이루어지는데, ‘머리’부분의 크기는 해당 인지질이 갖는 구조를 결정하고 ‘꼬리’의 탄소 수와 불포화결합 정도는 인지질이 막 내에서 갖는 유동성을 결정한다 (Harayama & Riezman, 2018). 머리 부분이 상대적으로 큰 PE와 CL는 전체 인지질의 형태가 원추형(conical)을 띄는 반면, 인지질 머리가 크지 않은 PC와 PI는 사각기둥의 형태를 띄어 평평한 인지질 이중층을 형성한다(Basu Ball et al., 2017) (그림1). 반면 원추형을 띄는 인지질(PE, CL)은 이중층을 형성하지 않고 세포막에 음의 곡률(negative curvature)을 증가시키고 stress를 가하여 세포막의 융합과 분열에 필요한 에너지를 낮춰주는 요인으로 작용한다 (Osman et al., 2011; Frohman, 2015). 또한 원추형의 인지질은 hexagonal phase라는 독특한 구조를 형성하기 쉬운데, 이 구조는 막의 융합 과정에서 공통적으로 발견되는 구조이다 (Jouhet, 2013) (그림1). 인지질의 조성에 따라 융합 또는 분열에 적합한 환경이 갖춰진다. 이중에서 미토콘드리아 막의 융합(fuswaion)에 적합한 환경을 만드는 인지질은 PE이다.

1.4. PE 합성과 Phosphatidylserine Decarboxylase

미토콘드리아에서 PC와 더불어 가장 많은 양을 차지하는 PE는 주로 2가지 경로에 의해 합성된다(Schuiki & Daum, 2009). 포유류의 세포는 PS를 전구체로 하는 phosphatidylserine decarboxylation pathway 와 ethanolamine (Etn)을 전구체로 하는 Kennedy pathway(CDP-Etn pathway)으로 미토콘드리아의 PE를 합성한다(그림 1). Psd는 미토콘드리아 내막의 바깥쪽에 존재하지만 Kennedy pathway의 효소인 Ept는 소포체에 존재한다 (Flis & Daum, 2013). Psd의 기질이자 PE의 전구체인 PS는 dPtdss1(*Drosophila* phosphatidylserine synthase1) 효소에 의해 만들어지며, 이 효소는 소포체와 미토콘드리아의 막이 만나는 부분(Mitochondria-associated membrane, MAM)에 위치한다. 흥미로운 사실은 Psd와 Ept의 위치가 다르다는 것뿐만 아니라, 이 효소들이 각각 합성하는 PE의 성격이 서로 다르다는 데에 있다. Psd와 Ept가 합성하는 PE는 각각 탄소의 수, 불포화결합의 수가 다르며 이로 인해 막의 유동성 등에 미치는 영향이 달라지게 된다 (Bleijerveld, Brouwers, Vaandrager, Helms, & Houweling, 2007) (Harayama & Riezman, 2018). 또한 Ept가 합성하는 PE는 소포체와 미토콘드리아 사이에서 비교적 균등하게 분포하게 되지만, Psd가 합성하는 PE는 대부분 합성장소인 미토콘드리아에 머문다(Bleijerveld et al., 2007). 생성물의 종류가 다르다는 점(PE의 성질)과 미토콘드리아 막의 PE를 구성하는 기여도에 있어서 차이가 있다는 점은 Psd가 미토콘드리아를 위해 특화된 효소라는 관점을 갖게 한다. 더불어 미토콘드리아에서 PE가 중요한 역할을 수행할 것이라는 예상을 하도록 한다. 그리고 선행 연구들에 비추어 보았을 때, 그 역할은 미토콘드리아의 기능에 필수적인 융합에

관련되어 있을 것이다.

일정한 비율로 유지되고 있는 인지질 조성이 변하게 되면 미토콘드리아 내막과 외막의 융합/분열 조절과 양상에 영향을 줄 것이고, 이것은 결국 미토콘드리아의 형태와 기능이 달라지게 한다. 인지질 합성 유전자를 미토콘드리아의 형태 조절 유전자로서 생각해볼 수 있는 것이다. 따라서 신경퇴행의 원인인 융합과 분열에 영향을 주는 인지질 합성 유전자의 이상으로 접근하는 것은 의미가 있을 것이다.

1.5. 연구 목표

신경계에서 미토콘드리아 갖는 중요성은 명백해 보인다. 그리고 미토콘드리아의 기능과 유지에 필수적인 막의 융합/분열에 인지질의 조성이 영향을 미친다는 사실을 고려한다면, 결국 신경계가 잘 유지되고 기능하기 위해서 인지질을 합성하고 분해하는 유전자의 역할이 중요할 것이다. 이러한 이유로 퇴행성 신경질환과 인지질 합성 유전자의 관계를 파악하는 것은 중요할 것이다.

미토콘드리아 융합의 중요성과 융합 과정에서 중요한 역할을 하는 PE의 기능 그리고 *Ps*d가 미토콘드리아에 중요한 PE를 합성하는 주된 효소라는 점을 생각해 보았을 때, *Ps*d의 기능과 돌연변이에 대한 연구를 미토콘드리아의 구조와 그에 따른 기능의 이상에 초점을 둘 필요가 있다. 또한 선행연구에서 PE의 합성경로의 또 다른 효소인 *dPtdss1* 유전자 돌연변이가 신경퇴행 표현형과 미토콘드리아 이상을 보였다(조민규, 2014; 이미화, 2018; 박예진, 2018). *dPtdss1* 돌연변이는 미토콘드리아에 존재하는 *Ps*d 효소에 PS를 전달하는데 이상이 생겼을 것이다. 이에 따라 *Ps*d 효소의 산물인 PE를 합성하지 못하여 미토콘드리아의 구조와 기능에 이상이 생겼을 것이라는 예상을

할 수 있다. 이러한 이유로 우리는 *Psd*가 미토콘드리아의 구조와 기능에 필수적이라고 보고, *Psd* 유전자 돌연변이는 미토콘드리아의 구조와 기능, 나아가 신경퇴행을 일으킬 것이라고 예상한다. 즉 인지질 합성 유전자의 기능이상인 구체적으로 어떠한 사건을 통해 신경퇴행을 일으키는지 확인할 필요가 있다. 따라서 본 연구에서 PE합성 경로의 마지막 효소를 암호화하는 *Psd* 유전자 돌연변이의 미토콘드리아를 구조와 기능의 변화에 대해서 연구하였다.

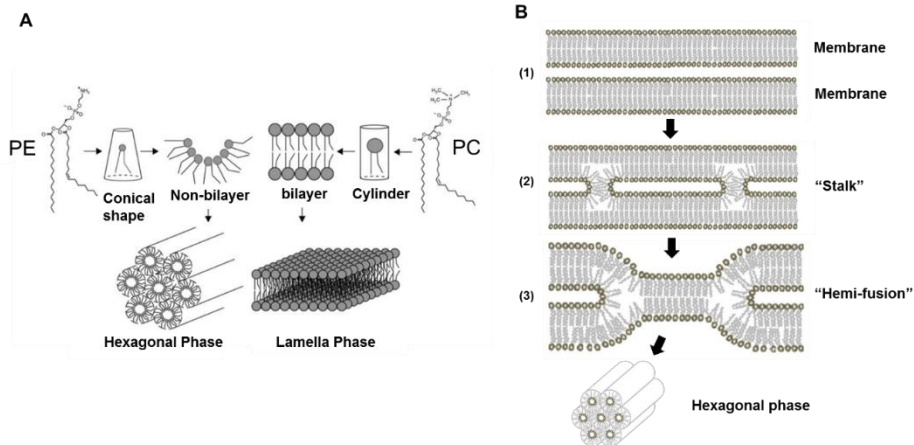


그림1. Phosphatidylethanolamine (PE)의 구조(Basu Ball, Neff, & Gohil, 2018) 와 세포 막의 융합(fusion) 과정 모식도(Jouhet, 2013).

(A)PE는 ‘머리’의 크기가 작아 conical 모양을 갖으며 이중층을 형성하지 않아 세포 막에 stress를 가하며, hexagonal phase를 형성한다. (B)세포막의 융합과정을 살펴보면, 먼저 2개의 이중막이 서로 접근한다(1). 부분적으로 인지질의 교환이 이루어져 ‘stalk’를 형성한다(2). 부분 융합 과정에서 hexagonal phase라고 하는 인지질의 독특한 구조가 융합 과정에서 발견된다. PE는 hexagonal phase를 형성하는 인지질로 막 융합 과정에 필요하다.

PE synthesis pathway

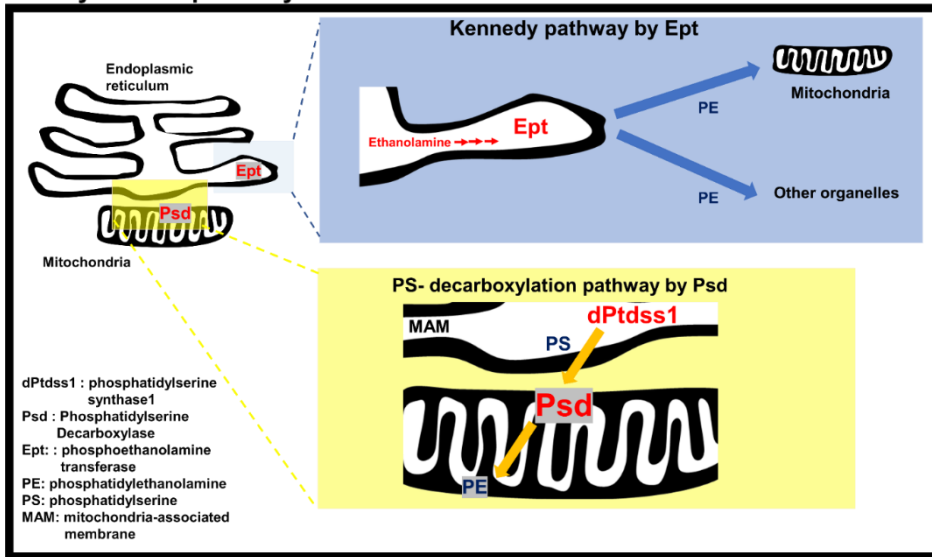


그림 2. PE 합성 경로 모식도

진핵 생물의 주된 PE 합성 경로는 ethanol을 전구체로 하는 Kennedy 경로와 PS를 전구체로 하는 phosphatidylserine Decarboxylation 경로이다. 두 경로의 마지막으로 작용하는 효소는 각각 Phosphoethanolamine transferase (Ept)와 phosphatidylserine decarboxylase(Psd)이다. 두 효소는 각각 소포체 막과 미토콘드리아 내막에 위치하여 서로 다른 특성을 갖는 PE를 합성한다. 소포체에서 Ept에 의해 합성된 PE는 미토콘드리아를 포함한 여러 세포 소기관으로 운반되지만, Psd에 의해 합성된 PE는 거의 대부분 미토콘드리아에 머문다(Bleijerveld et al. 2007).

제2장. 실험 방법 및 재료

2.1. 사용한 초파리

조직특이적으로 *Psd* 유전자의 발현을 억제하기 위해 UAS-RNAi 초파리와 Gal4 초파리를 교배하여 *Psd* RNAi (2 번째 염색체)와 *Repo-gal4*, *Mhc-gal4* (3 번째 염색체) 형질전환 유전자를 각각 갖는 초파리를 얻었다. *Psd* RNAi, *Repo-gal4* 및 *Mhc-gal4* 형질전환 유전자를 가지고 있는 초파리는 Bloomington stock center (# 67763, # 7415, # 55133)에서 구하였다. 초파리 스탥은 표준 옥수수 한천 배지에서 19 °C로 유지된 인큐베이터에서 유지했다.

2.2. 수명 측정

실험군과 대조군 초파리의 수명에 대한 분석은 별도의 10개의 관병에 1일차 초파리를 각각 20마리씩 수집하여 시작하였다. 1일차 성체 파리를 채집하여 표준 옥수수 한천 배지에서 29°C 및 50 % 습도로 키웠다. 3일에 한번 일정한 시간에 새로운 배지로 옮겨주면서 죽은 파리를 세었다. 파리가 배지안에서 죽으면 배지 바닥에 붙어버리는 경향이 있어서 손쉽게 죽은 파리를 셀 수 있었다.

2.3. Climbing assay

초파리는 중력 방향의 반대방향으로 거슬러 이동하려는 습성(Geotaxis)을 지니고 있다. 이러한 행동 특성을 이용하여, 초파리를

관병 바닥에 인위적으로 떨어트리면 관병 위로 기어 올라가게 되는 데, 이때 일정한 시간동안 올라간 거리를 측정하면 초파리의 운동 능력을 정량화 할 수 있다. 초파리를 20마리씩 지름3cm, 높이 25cm의 관병에 넣고 적당한 충격을 주어 바닥에 위치시킨다. 실험군과 대조군의 초파리들이 모두 바닥에 위치하였을 때 관병을 바로 세워두고 10초동안 이동한 거리를 측정한다. Climbing assay라고 하는 행동 측정 실험은 초파리의 신경퇴행 현상을 관찰하고 정량화할 수 있는 대표적인 실험이다(McGurk, Berson, & Bonini, 2015). 노화를 위해 1일차 수컷 초파리들은 29℃ 및 50 % 습도 조건에서 키웠다. 초파리가 오염된 배지에서 죽는 것을 막기 위해 3일에 한 번 배지를 새것으로 바꿔주었다.

2.4. 뇌 조직 단면의 관찰

신경퇴행의 양상을 확인하는 좋은 방법은 신경 조직의 형태를 직접적으로 관찰하는 것이다. 신경퇴행의 현상으로 여겨지는 뇌 단면에서의 공포의 형성은 뇌 조직에 지지체를 침투시킨 다음에 얇게 잘라서 만든 단면에서 드러난다(Sunderhaus & Kretzschmar, 2016). 이번 실험에서는 기존에 사용하던 molding방법을 개선하기 위해 Fly Collar라는 기구를 사용하여 실험하였다. Fly Collar는 일정한 금속 틀로 이루어져 있는데, 마취시킨 초파리의 머리를 Fly collar의 틀에 끼우게 된다. 이렇게 하면 실험 과정이 간편해질뿐만 아니라 무엇보다 초파리 뇌조직 절편을 대량으로 얻을 수 있으며, 초파리의 머리가 일정한 각도에서 마이크로톰에 의해 잘려지게 할 수 있다. 이렇게 하면 실험군과 대조군의 뇌가 좌-우 대칭이면서 비교적 동일한 면의 좋은 샘플을 얻을 수 있다(Au - Sunderhaus & Au - Kretzschmar, 2016).

플라이 칼라에 꿰어진 초파리 머리는 4시간 동안 상온에서 카노이 용액(60 % 에탄올, 30 % 클로로포름, 10 % 아세트산)에서 반응한다. 이 과정에서 초파리의 머리는 고정된다. 일정한 플라스틱 트레이에 용액과 Fly collar를 함께 두어서 반응시키면 편리하고 신속하게 실험을 진행할 수 있다. 4시간 뒤에 상온에서 Carnoy 용액을 제거한 뒤 미리 부어 놓은 에탄올에서 탈수를 진행한다. 탈수는 낮은 농도의 에탄올(95%)에서 높은 농도(100%)로 각각 30분씩 진행해야 높은 농도의 에탄올에서 일어나는 급격한 조직의 수축을 방지할 수 있다. 다음 Fly collar를 침투제인 자일렌 (xylene)으로 밤새 처리한다. 침투제는 파라핀과 잘 섞이며, 파라핀이 잘 침투하는 것을 돕는다. 다음날 자일렌과 파라핀 용액을 1:1 비율로 섞은 용액에 샘플을 30분씩 2회 반응시켜 초파리 뇌 조직으로 파라핀이 침투하도록 하게 한다. 그런 다음 30 분 동안 5 번 이상 100 % 파라핀 용액과 샘플을 반응시킨다. 이 과정은 뇌 조직에 남아있을 침투제 (자일렌)을 제거하는 위생 과정이다. 자일렌이 뇌 조직에 남아있으면 조직이 제대로 염색되지 못하여 공포(vacuole)로 착각하게끔 할 수도 있다. Fly collar를 트레이에 놓고 파라핀을 부어 성형 (mold)한다. 몰드를 트레이에서 분리하고 파라핀 절편을 얻기 위해 5 μ m 간격으로 마이크로톰을 사용하여 파라핀 블록을 자른다. 파라핀 절편은 주름이 가 있으므로, 이것을 펴기 위해 코팅된 슬라이드 글라스 위에 충분한 양의 물을 붓고 그 위에 파라핀 절편을 올려놓는다. 10분 정도 두면 파라핀 절편이 잘 펴질 것이다. 절편이 모두 펴지고 나면 물을 스포이드로 제거해서 절편이 장력에 의해 찢어지는 것을 막는다. 그리고 히트 블록에서 파라핀 슬라이스를 밤샘 건조시킨다. 다음날 샘플은 에오신-헤마톡 실린 염색법으로 염색한다. 이미지는 Zeiss Axio Imager A1 현미경을

사용하여 얻었다.

2.5. 미토콘드리아와 근 섬유의 항체 염색

초파리의 비행 근육은 초파리를 측면에서 보았을 때, 초파리의 비행 근육은 앞-뒤 축과 평행하게 배열되어 있다(그림3). 비행 근육은 근 섬유의 층 사이에 겹겹히 쌓여 있고, 크기가 비교적 크며, 정형화된 배열과 모양을 갖고 있기 때문에, 미토콘드리아 연구를 하기 위한 좋은 조직이다(Deng et al., 2008).

미토콘드리아 matrix에 풍부하게 존재하는 biotin과 특이적으로 결합하는 Streptavidin은 미토콘드리아의 구조를 관찰하기 위한 좋은 항체이다(Yoon et al., 2019). 기절한 초파리를 PBS를 뿌려 놓은 슬라이드 글라스 위에서 머리를 제거하고 4 % paraformaldehyde 용액에 1 시간 동안 고정시킨다. 고정액을 PBS 워싱으로 제거하고, 0.5 % PT 용액에서 5분간 반응시켜 조직의 투과성을 높인다. 항체 염색이 더 잘되게 하는 과정이다. 그런 다음 다시 PBS로 워싱을 하고, 마이크로 블레이드 또는 주사기를 사용하여 초파리의 비행 근육 단면을 얻는다. 초파리의 몸통을 등이 위를 향하게 위치시킨 뒤, x자로 교차하는 등 털의 중심을 지나면서 수직으로 자르면 비행 근육의 단면을 얻을 수 있다. 그런 다음 적어도 1 시간 이상 5 % BSA 용액과 반응시켜 항체의 비 특이적 결합을 방지(Blocking)한다. 근섬유의 액틴을 염색하기 위해 형광물질과 결합된 phalloidin (excitation 581nm, emission 609nm)을 4° C에서 밤새도록 반응시킨다. 그런 다음 PBS에서 여러 번 세척한다. 미토콘드리아를 염색하기 위해, 근육을 형광 물질과 결합한 streptavidin (excitation 495nm, emission 519nm) 과 4° C에서 밤샘 반응시킨다. 5 번의 PBS 세척 후 fluoromount-G 용액을 사용하여

시료를 마운팅 한다. PBS를 사용하는 모든 과정은 PBS를 반드시 4° C로 유지시켜야 완충 용액으로서의 기능을 수행할 수 있다.

2.6. DHE를 이용한 활성 산소(ROS)의 측정

활성산소는 미토콘드리아의 이상을 나타내는 중요한 지표이다. 활성산소의 측정은 살아있는 조직에서 이뤄져야 한다(Yang et al., 2017). 따라서 곤충 세포의 배양액인 슈나이더 배지(Schneider medium)에서 조직을 해부하는 것으로 실험을 진행하게 되었다. 초파리의 비행날개와 뇌 조직을 슈나이더 배지 안에 위치한 상태에서 해부하여 얻는다. 그런 다음 30 분 동안 실온에서 30 mM DHE가 들어있는 슈나이더 배지에서 10 분간 배양한 다음 슈나이더 배지로 최소 5 회씩 20 분 동안 워싱 하였다. Dihydroethidium(DHE) 용액은 superoxide free radicals에 의해 산화되어 ethidium (excitation 530 nm, emission 620 nm)을 형성하고 핵으로 들어간다 (Macchi et al., 2013). confocal 현미경의 z-stack 모드를 이용하여 초파리 뇌의 모든 층의 ethidium의 형광을 촬영하였다. 그런 다음 ImageJ 프로그램을 이용해서 모든 층의 형광을 합친 다음 평균 시그널의 세기를 측정하였다.

2.7. 미토콘드리아의 막 전위 측정

막 전위 측정은 다음의 논문을 참고하였다(Macchi et al., 2013). 초파리 성체의 머리를 제거하고 슈나이더 미디움에서 비행 근육을 주사기 바늘을 이용하여 수직으로 절단한다. 초파리의 등이 위를 향하게 한 상태에서 등 털의 중간 부분을 주사기 바늘 끝으로

누르다 보면 근육이 파이게 된다. 근육을 절단한 후 2mM의 JC-1용액을 슈나이더 미디움에 녹인 혼합액과 상온에서 45분간 반응시킨다. 다음 10분간 3번씩 슈나이더 미디움으로 워싱 한 뒤 슈나이더 미디움으로 마운팅을 하여 관찰한다. 올림푸스 BX51 현미경을 이용하여 촬영하였으며, z-stack mode로 근육 층을 모두 찍어서 사진을 얻었다. 정량화를 위해 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 붉은 형광 면적과 녹색 형광 면적을 각각 구하였다.

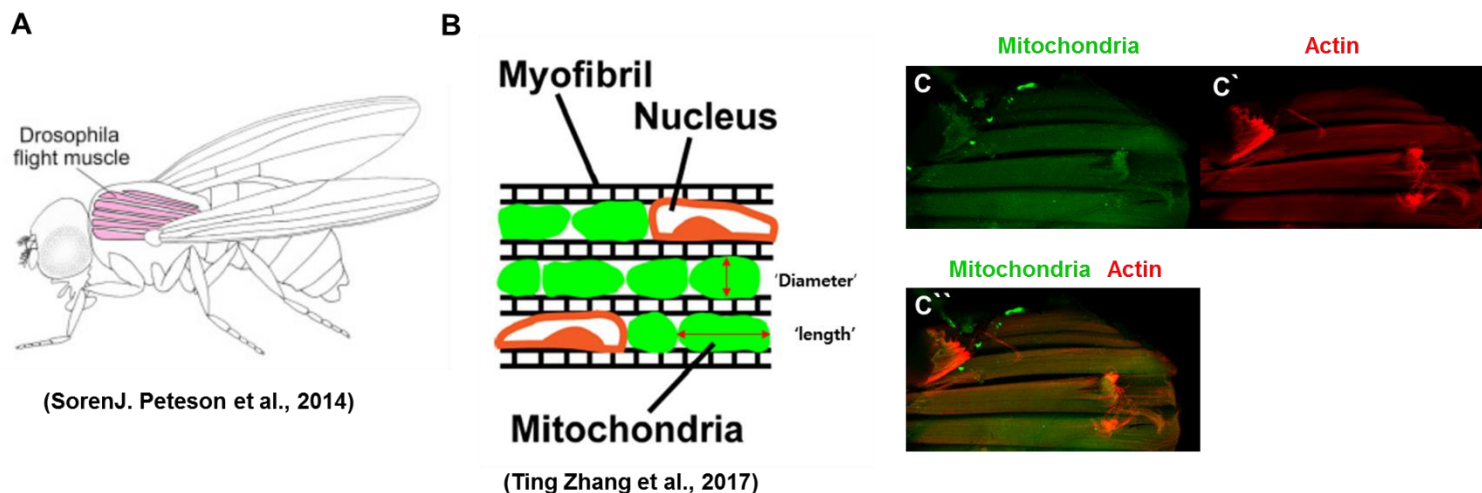


그림 3. 초파리 비행 근육의 모식도, 구조와 항체 염색 사진.

초파리의 비행근육은 측면에서 보았을 때 초파리 앞-뒤 축과 평행하다(A). 미토콘드리아(녹색)과 핵(오렌지 색)이 근원섬유(많은 양의 액틴을 포함한다, 검정색으로 표시)사이에 뺨뺨하게 위치한다. 미토콘드리아의 모양은 길이(가로 축을 따라 평행)과 지름(세로 축을 따라 평행)에 따라 규정된다. (B) 미토콘드리아 매트릭스는 biotin이라고 하는 비타민이 풍부하게 존재하기 때문에, 이 biotin과 특이적으로 결합하는 streptavidin을 활용한 항체염색법으로 탐지한다. (C) 근섬유는 phalloidin으로 염색할 수 있는데 이 물질은 액틴과 특이적으로 결합한다(C'). streptavidin과 phalloidin으로 근육을 이중 염색하면 근원섬유 사이에 위치한 미토콘드리아의 모양을 관찰할 수 있다(C'').

제3장 결 과

3.1. *Psd* 유전자의 돌연변이는 신경 퇴행성 표현형을 보였다

우리는 개체 수준에서 *Psd*의 교세포 특이적 발현 억제 돌연변이 초파리(*Repo>Psd RNAi*)가 신경퇴행을 보이는지 확인하였다. 우선 두드러진 *Psd* 돌연변이의 수명 감소를 확인하였다(그림 4). 대조군(*Repo-gal4/+*) 초파리는 중간 생존 (T50 값)이 30 일에 이르는 반면, *Psd* 돌연변이 파리에서는 25 일로 감소했다 (그림 4A). 신경 퇴행이 일어난 초파리의 수명은 모두 감소하게 된다. 그 역은 성립하지 않지만, 어떤 유전자의 돌연변이가 생긴 초파리가 수명이 감소하지 않으면 그 유전자는 신경 퇴행을 일으킨다고 판단하기 어려울 것이다. 초파리가 감소하는 양상도 실험군과 대조군에서 유사하게 나타났다. 즉 초파리의 생존율이 급격하게 감소하는 시점은 대조군이 27일, 실험군이 18일이고, 중간 생존(T50)일은 대조군이 33일 실험군이 25일이다. 급격하게 감소하기 시작한 날과 중간 생존일의 차이는 실험군과 대조군에서 각각 7일과 8일로 거의 동일하다. 생존율의 감소 양상이 유사하기 때문에, 실험군과 대조군의 생존율의 차이는 단일한 요인에 의한 것이라고 생각된다.

두 번째로, 교세포 특이적 *Psd* 유전자 돌연변이 파리는 climbing 능력의 손상을 보였다 (그림 5). *Psd* 돌연변이 초파리는 10일차와 20일차에서 일정시간 동안 관병을 올라가는 높이가 대조군 초파리에 비해 낮을 뿐만 아니라 노화를 함에 따라 climbing 능력의

감소율(실험군 32%, 대조군 23%)이 더 크게 나타났다. 유전적인 요인이 노화에 따른 climbing 능력의 감소를 촉진시키는 듯하다.

셋째, 우리는 돌연변이 뇌에서 Reactive Oxygen Species(ROS) 수준을 측정했다. 이전의 연구에서와 마찬가지로, 돌연변이 파리(*Repo>Psd RNAi*)의 ROS농도는 대조군 파리 (*Repo-gal4/+*)와 비교하여 초기 단계에서부터 유의하게 증가했다 (그림 7). ROS의 주된 생성 요인은 미토콘드리아이며, ROS가 너무 높거나 낮은 상태는 미토콘드리아의 기능 이상을 의미하며(Willems et al., 2015) 신경퇴행의 원인이 될 수 있다(Kim et al., 2015).

마지막으로 *Psd* 유전자가 신경계의 유지에 필요한지 확인하기 위해 조직 염색법으로 초파리의 뇌 단면에서 공포가 형성되는지 확인하였다(그림 6). 퇴행성 신경질환은 뇌 조직에 구멍(공포)이 생기는 현상을 수반한다(McGurk, Berson, & Bonini, 2015). 돌연변이 초파리는 노화함에 따라, 뇌의 중앙부와 optic lobe에서 $3\mu\text{m}$ 이상의 공포가 발생하였다(그림 6). 초파리가 20일차가 되자 실험군 (*Repo>Psd RNAi*)에서 공포가 많이 생겨났다. H&E염색법에서 분홍색으로 나타나는 부분은 neurophile로 신경세포의 축색돌기와 수상돌기 그리고 교세포가 밀집해있다. 추가적으로 초파리 뇌의 파라핀 절편의 형광을 관찰하였다(그림6C, D). 초파리 뇌의 색소 세포는 자체적으로 형광을 띄는 성질을 이용하였다. 10일차 돌연변이 초파리는 neurophile에서 공포가 형성되었는데(그림6B), 뇌의 피질 부분에는 어떤 변화가 있는지 살펴보고자 하였다. 선행연구에서는 *dPtdss1*의 교세포 특이적 돌연변이는 cortex에서 세포핵이 소실되는 것이 발견되었기 때문이다(박예진, 2018). *Psd* 유전자의 교세포 특이적 돌연변이 또한 10일차에 피질 부분의 핵이 소실되는 것을 관찰할 수 있었다(그림6D).

초파리의 수명과 행동의 이상, ROS의 증가, 뇌 조직의 손상은 대표적인 신경 퇴행의 병리적 현상으로 여겨진다(Liu et al., 2018; McGurk et al., 2015.) 이 결과는 *Psd* 유전자의 기능 상실 (loss-of-function)은 퇴행성 신경질환의 표현형을 보인다는 것을 말해준다. *Psd*와 *dPtdss1*은 PE합성경로의 효소로서, 이 두 유전자의 돌연변이가 신경 퇴행을 나타낸다는 것은 PE합성경로가 신경퇴행의 원인임을 간접적으로 보여준다. 또한 그 원인은 PE가 미토콘드리아에서 중요한 역할을 수행하기 때문에 미토콘드리아의 이상과 관련 있을 것이다.

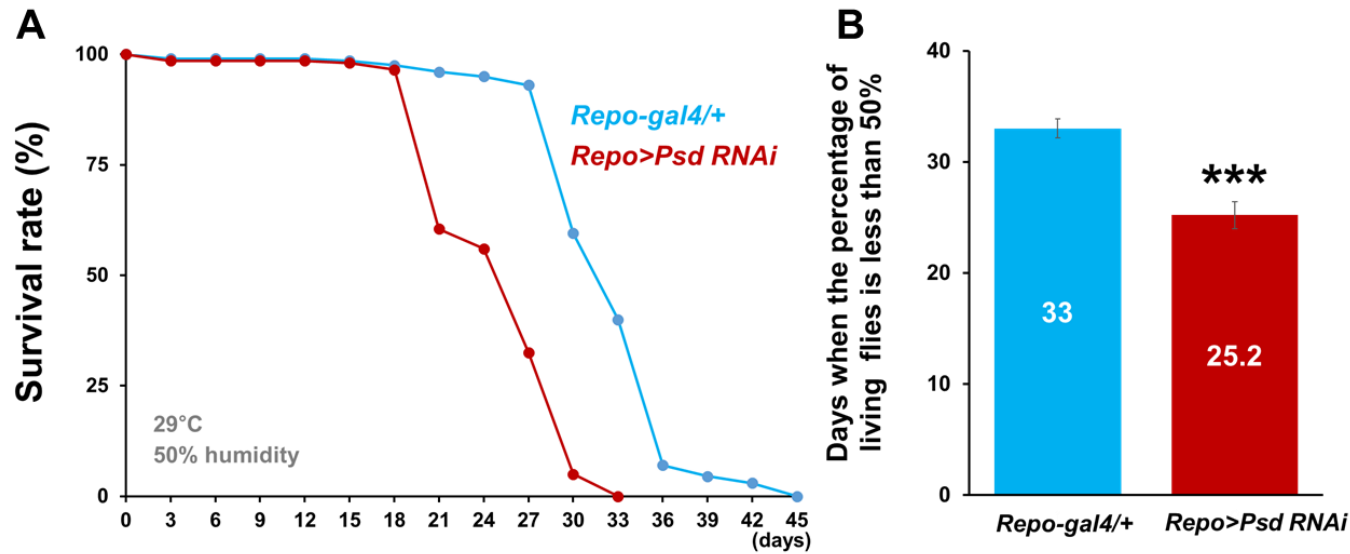


그림 4. 교세포의 Psd 유전자 돌연변이에서 나타나는 평균 수명의 감소

(A) 돌연변이 초파리 (Repo> Psd RNAi)는 태어난 지 19 일차에 생존율이 급격하게 감소하기 시작한다. 대조군 초파리는 (Repo-gal4/+) 태어난 지 30일이 되어서야 급격하게 죽기 시작한다. 돌연변이 초파리는 33일차에 모두 죽었고, 대조군 초파리는 45일이 되어서야 모두 죽는다. (B) T50 값 비교. 대조군 파리의 중간 생존 (T50 값)이 33 일에 이르는 반면, Psd 돌연변이 파리에서는 25 일로 감소했다. (**P<0.001; Student's t-test)

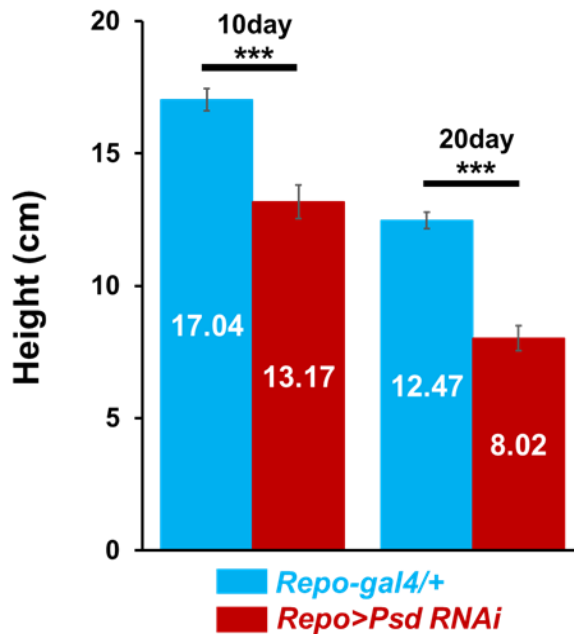


그림 5. 교세포의 Psd 유전자 돌연변이에서 나타나는 운동 능력의 감소
돌연변이 초파리(*Repo>Psd RNAi*)는 10 일에서 20 일 사이의 노화함에 따라 관병 벽을 올라가는 능력이 대조군 초파리(*Repo-gal4/+*)에 비해 크게 감소했다 (대조군에서 26 % 감소, 돌연변이에서 40 % 감소). 또한 돌연변이 초파리의 관병 벽을 올라가는 능력 자체도 10일차와 20일차에서 대조군 초파리(*Repo-gal4/+*)에 비해 모두 저하된 모습이다. (** $P < 0.001$; Student's *t*-test). 대조군과 실험군의 $N=100$. 오차막대는 표준오차를 나타낸다.

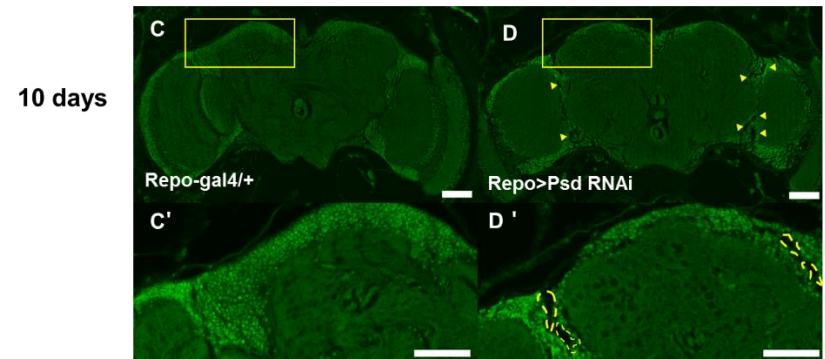
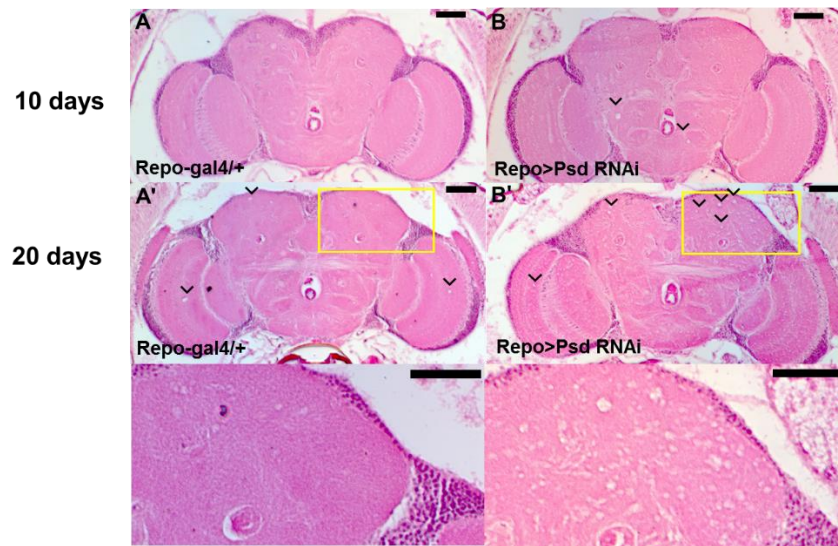


그림6. 교세포의 Psd 유전자 돌연변이에서 나타나는 뇌 조직의 손실

(A, B) 초파리 뇌 조직의 헤마톡실린&에오신 염색법으로 염색 후 현미경으로 관찰한 모습. 돌연변이 초파리(Repo>Psd RNAi)는 태어난지 10일이 되는 시점부터 뇌 조직에서 공포(vacuole)이 형성된다 (B). 20일차가 되면 대조군 초파리(Repo-gal4/+)보다 확연하게 공포가 늘어난다 (B'). (C, D) 초파리의 뇌에 존재하는 색소세포가 형광을 자체적으로 띄는 것을 이용하여 뇌 절편을 형광으로 찍은 모습. 10일차부터 돌연변이 초파리의 피질(Cortex)에 존재하는 세포핵은 소실되기 시작한다. Scale bar = 100um

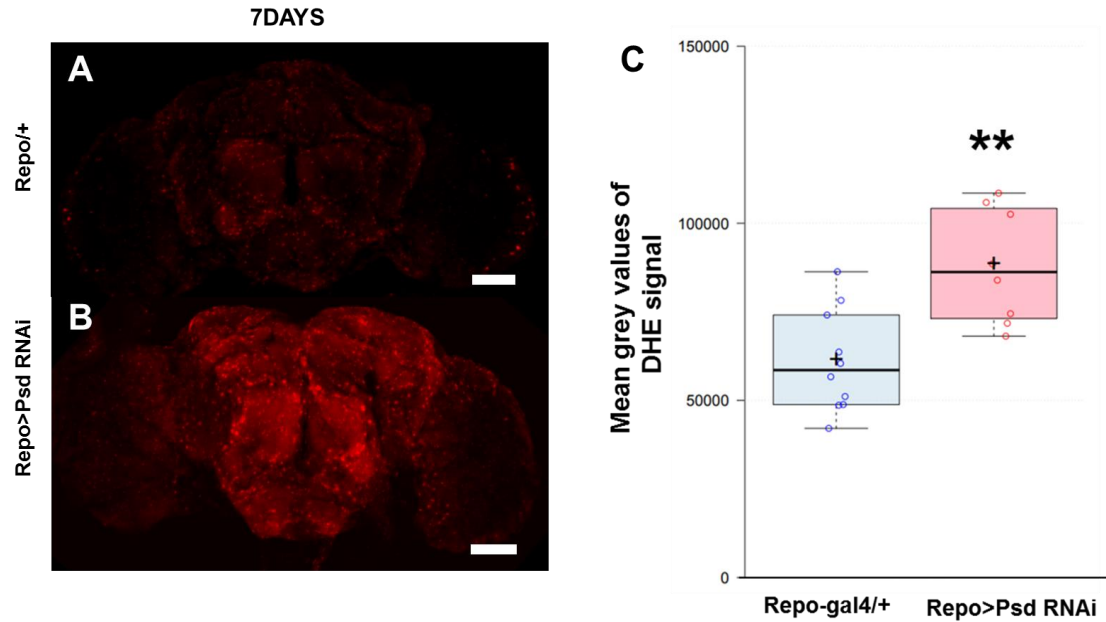


그림 7. 교세포의 Psd 유전자 돌연변이에서 나타나는 ROS level의 증가

(A, B) 초파리의 성체 뇌를 ROS 탐지체인 DHE로 염색하였다. DHE는 조직의 ROS 양에 비례하여 형광을 나타낸다. *Psd* 유전자 돌연변이 초파리의 뇌 조직에서 DHE 신호가 대조군 초파리의 DHE 신호보다 뚜렷하다. (C) DHE 신호의 정량화. 돌연변이 초파리의 ROS 양은 유의미하게 증가한다. (** $P < 0.01$; student's t-test). Scale bar=50um

3.2. *Psd* 유전자의 돌연변이가 초파리는 미토콘드리아가 분절된 형태를 보였다

Psd 유전자의 돌연변이가 미토콘드리아의 융합(fusion)에 영향을 주는지 확인하기 위해서 성체 초파리의 근육을 항체염색 하였다. 초파리의 근육 조직은 에너지 요구가 높기 때문에 미토콘드리아는 서로 연결된 상태, 즉 융합(fusion)되어 있다(Westermann, 2010). 근육 조직에서 융합된 미토콘드리아는 관 모양(tubular)을 띄게 된다.

조직 특이적 유전자 발현의 조절을 위해 UAS-gal4 시스템을 사용하였다. 근육에서 특이적으로 발현하는 Gal4 라인과 *Psd* 유전자의 발현을 억제할 수 있는 UAS-*Psd* RNAi 라인을 교배하여 두 가지 형질 전환 유전자를 모두 갖는 초파리를 얻었다. *Psd* 유전자를 Da-Gal4, 즉 모든 종류의 세포에서 발현하는 Gal4으로 *Psd* 유전자의 발현을 억제하였을 때는 초파리가 번데기 시기에서 깨어나지 못하고 모두 죽었다. 반면 근육 조직 특이적 *Psd* 유전자의 발현 억제 초파리는 성체까지 잘 자랐다. 하지만 이 초파리가 30일까지 노화하였을 때, 비행 근육에서 미토콘드리아가 융합(fusion)된 상태로 유지되지 못하고 분절(fragmentation)되고 말았다(그림 8) 미토콘드리아 형태를 정량화하기 위해서 2가지 기준을 적용하였다. 한가지는 미토콘드리아의 면적으로 100개의 사코미어의 면적에서 미토콘드리아가 차지하는 면적의 비율이다(percent area). ImageJ 소프트웨어를 이용하여 초록색 형광으로 염색된 부분의 면적 (미토콘드리아 매트릭스) 만을 구할 수 있었다. 일정한 범위 내에서 미토콘드리아가 차지하는 비율을 측정하였다. 두번째 기준은 미토콘드리아의 길이와 지름의 비율 (aspect ratio)로 이 비율이 1에 가깝다는 것은 길이와 지름이 동일한 상태로 미토콘드리아의 형태가 원에 가깝다는 것을 의미하며 1보다 큰 값은

길이 (앞-뒤 축과 평행한)가 지름에 비해 더 길어서 미토콘드리아의 형태가 관 모양 (tubular)을 띄고 있음을 의미한다(Rai et al., 2014).

대조군 초파리 (Mhc-gal4/+)에서는 미토콘드리아가 서로 융합 (fusion)되어 큰 섬유와 나란히 선형으로 배열되고 서로 연결되어 관 모양 (tubular)을 띄고 있다 (그림 8A). 대조군의 미토콘드리아는 크기가 비교적 크고 (면적 평균 $44.479 \% \pm 1.203 \%$, 그림 8D) 종횡비율 (aspect ratio)이 1 이상으로 원형이 아닌 길게 늘어진 막대 또는 관 모양을 보인다 (평균 종횡비 2.991 ± 0.2143 , 그림 8C). 이와 달리, *Psd* 돌연변이 초파리는 미토콘드리아의 면적이 줄어들어 보였다 (평균 면적 $21.677 \% \pm 5.3060\%$, 그림 8D). 모양은 종횡비가 1을 나타내며 실제 현미경 상으로도 둥근 모양이 뚜렷하게 관찰되었다. (평균 종횡비 1.1086 ± 0.0841 그림 7C).

마지막으로 표현형을 정량화 하기 위해 3개의 sarcomeres 당 미토콘드리아의 수를 세었는데, 대조군 초파리에 비해 돌연변이 파리의 미토콘드리아 수가 1.7 배 증가했다 (그림 8E). 이것은 미토콘드리아 단편화의 또 다른 지표일 것이다. 융합은 미토콘드리아가 연결되어 하나로 보이게끔 하지만, 분절은 미토콘드리아의 수가 늘어나게끔 한다.

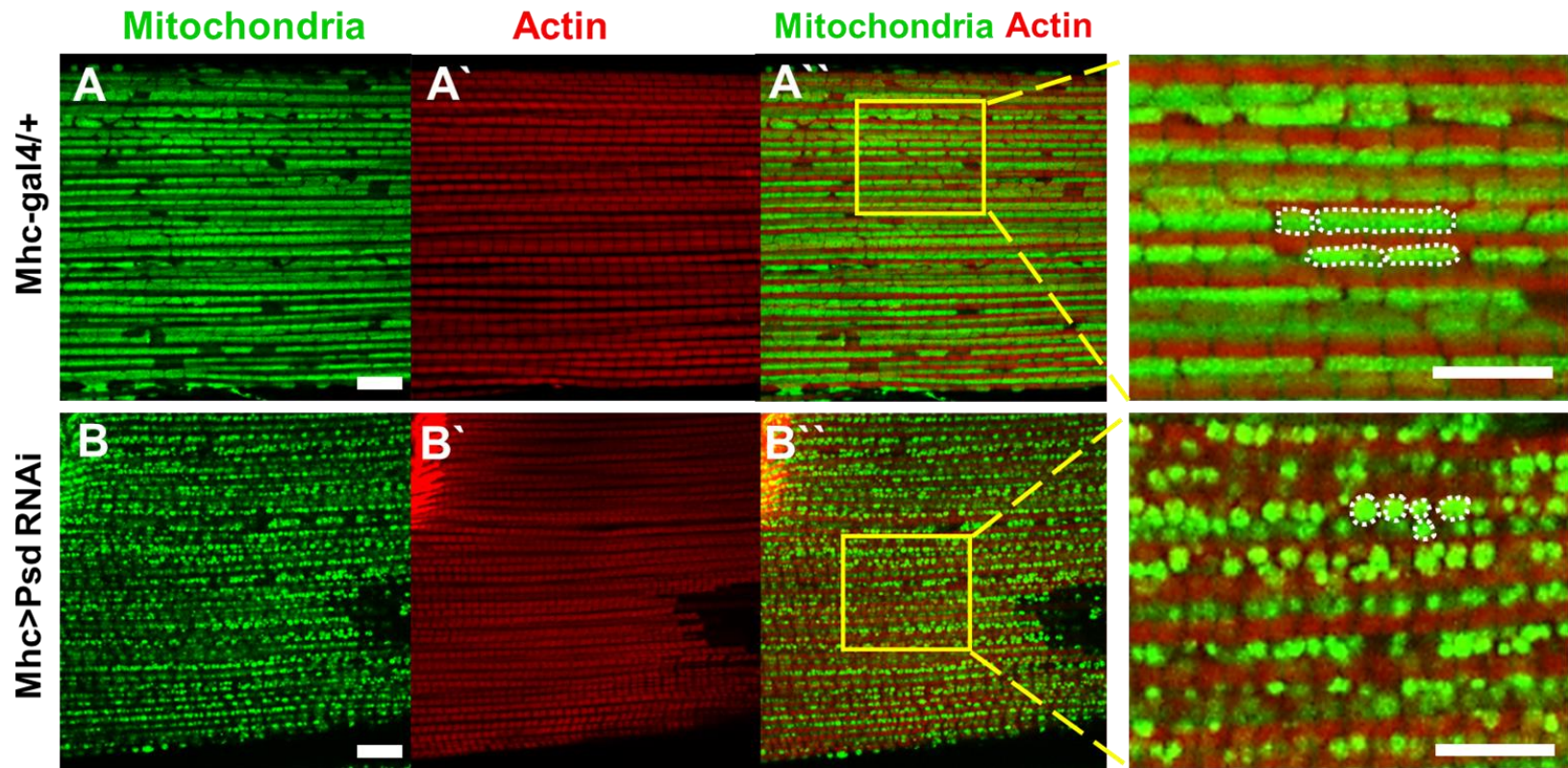


그림 8. Psd 돌연변이에서 나타나는 미토콘드리아 모양의 변화

(A) 30일차 대조군 초파리 (Mhc-gal4/+)는 미토콘드리아가 서로 fusion되어 관 모양(tubular)으로 보인다. (B) 돌연변이

초파리 (*Mhc>Psd* RNAi)의 비행 근육 미토콘드리아는 원형을 띄며 서로 연결되어 있지 않고 분절(fragmentation)되어 있다. 대조군 초파리 (*Mhc-gal4/+*)에 비해 매트릭스 면적이 줄어들어서 미토콘드리아 사이에 염색되지 않은 공간이 드러난다. 또 미토콘드리아가 선명하게 염색되며, 미토콘드리아 간 경계가 명확한 것이 특징이다. Scale Bar = 10um

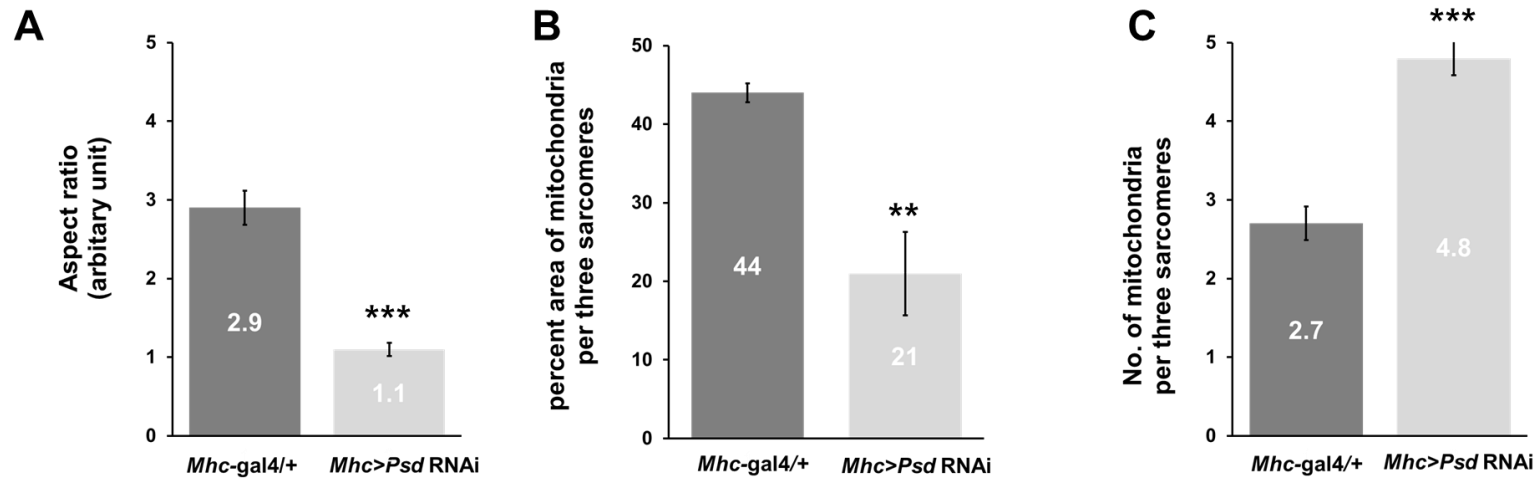


그림 9. Psd 돌연변이 미토콘드리아 형태의 정량화

(A) 미토콘드리아의 종횡비는(길이/반지름) 돌연변이 초파리(*Mhc>Psd RNAi*)에서 확인하게 줄어들었다 (*** $P < 0.001$; student's t-test); 대조군 초파리 $n=4$, 실험군 초파리 $n=4$) (B) 미토콘드리아의 면적도 돌연변이에서 크게 감소한다 (** $P < 0.01$; Student's t-test); 대조군 초파리 $n=4$, 실험군 초파리 $n=4$) (C) 3개의 사코미어에 존재하는 미토콘드리아의 수는 뮈턴트 초파리(*Mhc>Psd RNAi*)에서 약1.7배 늘어났다(*** $P < 0.001$; student's t-test); 대조군 $n=4$, 실험군 $n=4$. 이것은 미토콘드리아 분절화(fragmentation)의 또 다른 지표이기도 하다. 막대는 표준 오차를 의미한다.

표 1. 현재 알려져 있는 미토콘드리아 융합/분열을 조절하는 유전자의 돌연변이 표현형. 미토콘드리아의 길이, 지름, 상대 면적을 통해 판단을 해보면 *Psd* 유전자 돌연변이의 미토콘드리아 모양은 *Marf* 돌연변이의 미토콘드리아 모양과 유사하다. *Marf*는 미토콘드리아의 외막 융합 단백질인 mitofusin을 암호화한다. *Marf* 와 *Opa1* 돌연변이의 미토콘드리아 모양은 (Scholtes et al., 2018)에서 인용하였다.

해당하는 유전자의 돌연변이에 대한 미토콘드리아의 표현형				
Gene	길이	지름	상대면적	모양
<u>Marf</u>	감소 (분절화) (Scholtes et al., 2018)	감소 (Scholtes et al., 2018)	감소 (Scholtes et al., 2018)	I <i>Marf RNAi</i>
<u>Opa1</u>	감소 (Scholtes et al., 2018)	야생형과 동일 (Scholtes et al., 2018)	야생형과 동일 (Scholtes et al., 2018)	Y <i>Opa1 RNAi</i>
<u>Psd</u>	감소 (This research)	감소 (This research)	감소 (This research)	<i>PSD RNAi</i>

3.3. *Psd* 돌연변이 미토콘드리아는 막 전위가 감소하였다.

생물은 구조와 기능이 연관되어있다. 미토콘드리아에서도 마찬가지이다. 미토콘드리아 형태는 미토콘드리아 기능과 매우 관련되어 있고 이 두가지 요인에 대한 연구도 활발하게 진행되고 있다. 미토콘드리아의 형태 (융합과 분열)는 기능에 영향을 주며 그 반대의 경우도 마찬가지이다(Willems et al., 2015). 미토콘드리아의 기능성을 평가하는 척도로 가장 많이 사용하는 것은 미토콘드리아의 막 전위 ($\Delta\psi$)이다. 막 전위($\Delta\psi$)는 전자전달계의 흐름으로부터 형성된 수소이온의 불균등한 분포로 형성된 전위의 차이이다. 수소 이온의 농도가 낮은 내막 안쪽은 음의 전하를, 수소 이온의 농도가 높은 내막 바깥 쪽은 양의 전하를 띈다. 막 전위는 ATP합성 뿐만 아니라, 막을 통한 물질의 수송, 마이토파지 과정에서 중요한 역할을 하는 기능적 단위이다(Zorova et al., 2018). 우리는 *Psd*가 정상적인 미토콘드리아 형태에 필요하다는 것을 확인하였기 때문에, *Psd* 유전자의 기능손실이 미토콘드리아의 기능에까지 영향을 줄 수 있는지 확인하기 위해 대조군과 실험군과 초파리 근육에서 각각 $\Delta\psi$ 를 측정하여 비교하였다. 미토콘드리아 $\Delta\psi$ 를 측정하기 위해 비행 근육을 $\Delta\psi$ 에 의존하는 형광물질인 JC-1라는 형광물질로 염색하였다 (그림 10). JC-1은 낮은 $\Delta\psi$ 에서 단량체 형태로 존재하며 이것은 529nm(녹색) 파장대의 형광을 방출한다. 높은 $\Delta\psi$ 는 ~590 nm (적색)의 최대 방출을 갖는 JC-1 적색 형광 응집체를 생성하게 한다. 따라서 상대적인 적색: 녹색 형광 강도의 측정은 $\Delta\psi$ 를 정량화해주는 지표이다(Wang, Clark, & Geisbrecht, 2016). 예상대로, 미토콘드리아 분열(fragmentation)로 이끄는 *Psd* 돌연변이는 근육에서 대조군 JC-1 응집체보다 근육에서 JC-1 응집체의 면적이 적다 (그림 10). 또한 대조군에서는 높은

$\Delta\psi$ 을 의미하는 적색 형광이 서로 연결된 형태를 띄고 돌연변이에서는 적색 형광이 서로 끊어져 있다. 이는 대조군과 실험군의 근육에서 각각 미토콘드리아의 연속성과 불연속성에 따른 $\Delta\psi$ 의 유지와 소실을 의미할 것이다. 결론적으로 *Psd* 돌연변이가 미토콘드리아의 모양뿐만 아니라 기능에도 영향을 준다는 것을 확인하였다.

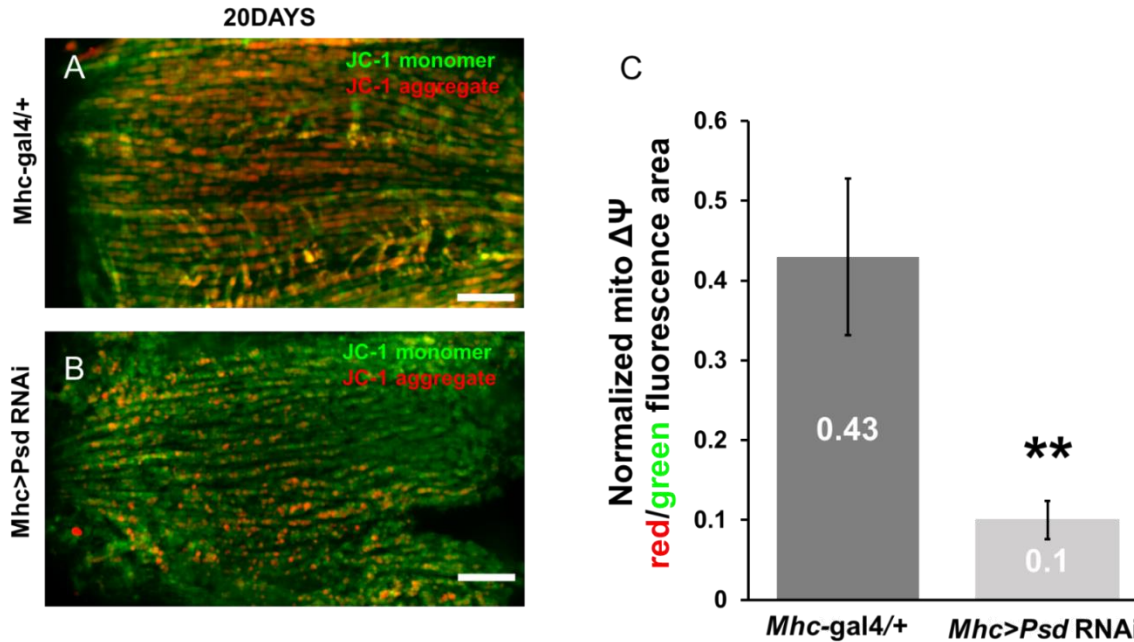


그림 10. Psd 유전자 돌연변이에서 나타나는 미토콘드리아 막 전위($\Delta\Psi$)의 감소

(A, B) 성체의 비행 근육을 JC-1 형광물질로 염색하였다. JC-1 단량체 (녹색 형광)는 미토콘드리아 막 전위의 강도에 비례하여 미토콘드리아에 축적된다. JC-1의 축적은 JC-1 응집체가 쌓이게 하는데 응집체는 적색 형광을 띄게 된다. 따라서 녹색 형광에 대한 적색 형광의 면적은 막 전위($\Delta\Psi$)의 세기와 비례할 것이다. (C) 막 전위($\Delta\Psi$)의 정량화. 녹색 형광을

나타내는 면적에 대한 적색 형광의 면적의 비율을 나타낸다. 이 비율은 미토콘드리아의 막 전위의 크기와 비례할 것이다. *Psdl* 유전자 돌연변이 초과리는 이 비율이 낮게 나타나는데 이것은 돌연변이가 막 전위($\Delta\psi$)를 소실하였음을 의미한다. 또한 적색 형광이 이어지지 않고 끊어진 양상을 보이는 것은 미토콘드리아가 단편화 되는 현상과 관련 깊을 것이다(** $P < 0.01$; student's *t*-test. 그래프 보조 막대는 표준편차를 의미한다. Scale bar=100um. N=5

3.4. *Psd* 돌연변이는 ROS가 증가하였다.

미토콘드리아의 구조(융합과 분열)와 기능적 상태($\Delta\psi$, ATP)는 활성산소(ROS)의 발생과 밀접하게 연관되어 있다. (Willems et al., 2015). ROS는 미토콘드리아 내막의 전자전달계에서 일어나는 전자의 흐름으로 발생한다. 전자가 전자전달계로부터 새어 나가(leakage) 산소와 직접 반응하거나, 전자와 반응한 산소를 다시 산화시키지 못하는 것이 ROS 형성의 원인이다(Murphy, 2009). 활성산소(ROS)는 유전자 전사 조절, 신호전달, 면역반응 등과 같은 중요한 세포 활동에 관여한다. 하지만 너무 높은 농도의 ROS는 미토콘드리아와 세포내의 유전물질과 단백질, 인지질 등과 반응하여 이것들을 변성시켜 세포에게 독성을 작용한다(Liu et al., 2018). 선행 연구들은 미토콘드리아의 단편화(fragmentation)와 막 전위 ($\Delta\psi$)의 감소가 ROS 증가와 관련이 있음을 보여준다(Picard et al., 2011). 결국 ROS의 양을 측정하는 것은 미토콘드리아의 이상과 나아가 그 조직이 얼마나 병변 상태에 처해있는지를 보여준다.

Psd 돌연변이에 의한 미토콘드리아의 분절화 (그림 8B) 및 미토콘드리아 막 전위 손실 (그림 10B)이 ROS 발생의 증가로 이어지는지 확인하기 위해, superoxide free radical의 농도와 비례하여 형광의 세기가 증가하는 DHE (dihydroethidium) 염료를 사용하여 대조군과 *Psd* 돌연변이 개체의 근육조직에서 ROS 수준을 비교하였다 (Macchi et al., 2013). *Psd* 돌연변이 파리 비행 근육 (그림 11)에서 측정된 ROS 수준이 대조군보다 높은 것을 관찰할 수 있었다. 이 결과는 *Psd* 유전자의 신경 교세포 특이적 돌연변이 개체의 뇌에서 ROS 농도가 대조군 초파리에 비해 증가한것과 같이(그림 7) 근육 조직에서도 *Psd* 유전자 돌연변이는 ROS양이 대조군 초파리에 비해 증가함을

보여준다(그림 11). ROS의 발생은 막 전위 손실 및 전자전달계 손상에 의한 산화적 인산화의 결핍을 원인으로 한다고 해석되고 있다(Macchi et al., 2013). 즉 미토콘드리아의 기능적 상태($\Delta\psi$, ATP)와 ROS의 발생은 밀접하게 연관되어 있으며 두 가지 요인 또한 서로에게 영향을 줄 수 있는 것으로 생각된다. ROS의 증가는 PE합성경로의 인지질 합성 유전자 (*dPtdss1*, *Psd*)의 돌연변이에서 공통적으로 관찰된다. 이는 미토콘드리아가 활성산소를 일정한 수준으로 유지하는 능력을 상실하였거나, 항산화제 작용에 의한 ROS의 산화 속도보다 ROS의 생성속도가 더 높은 병적 상태에 처해 있음을 의미한다. 그리고 이는 미토콘드리아 이상과 관련 있을 것이다.

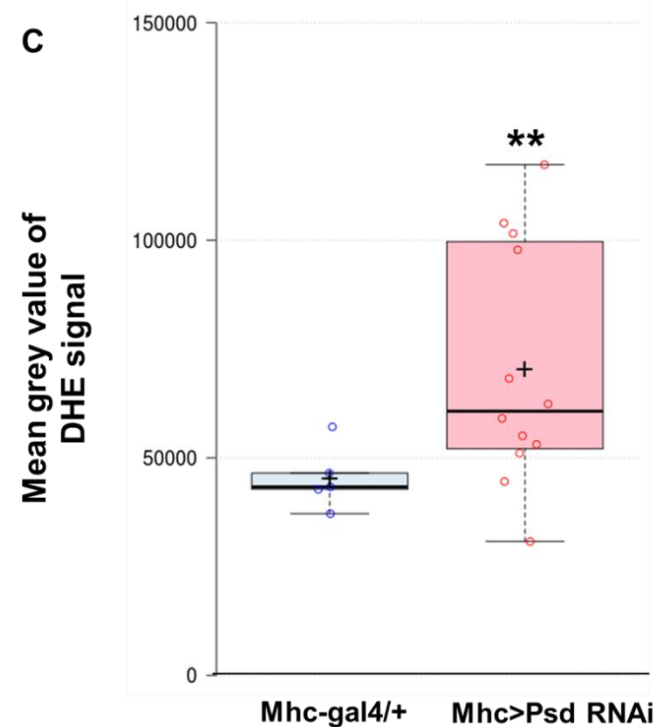
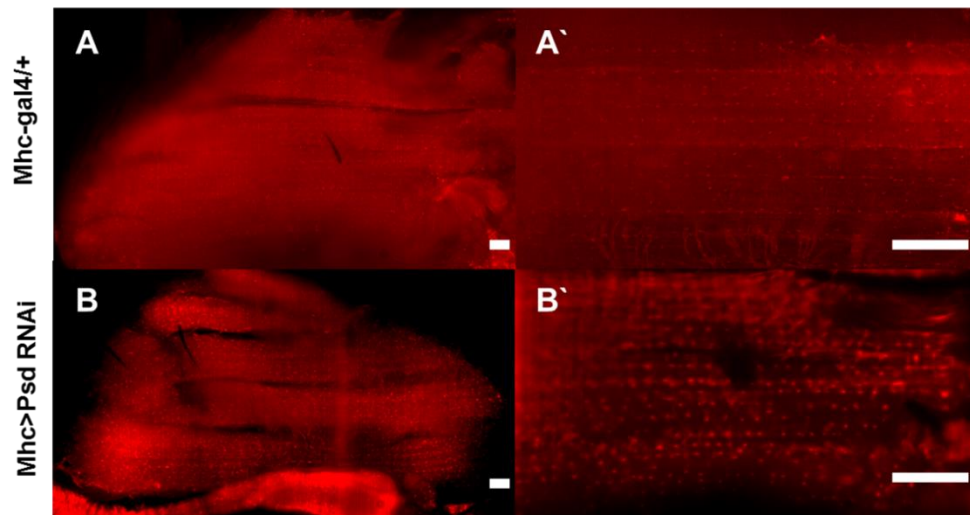


그림 11. Psd 유전자 돌연변이에서 나타나는 ROS level의 증가

(A, B) ROS 양을 대조군 초파리 (Mhc-gal4/+, A)와 돌연변이 파리 (Mhc>Psd RNAi, B)에서 측정하였다. superoxide free radical은 ROS의 대표적인 물질로, 이것의 농도에 직접적으로 비례하는 dihydroethidium (DHE) 염료를 사용하여 control

(A)와 *Psd* (B) mutant에서 ROS의 양을 비교했다. DHE는 ROS와 반응하여 세포의 핵으로 이동하며 붉은색 형광을 띤다. 좌-우로 평행하게 배열되어 있는 근육 조직의 핵이 붉은색으로 염색된 모습을 관찰할 수 있다 (A, B). 앞선 실험에서 미토콘드리아의 구조와 기능에 이상이 생긴 돌연변이 초파리 (*Mhc>Psd* RNAi)는 ROS가 나타내는 형광의 세기가 대조군에 비해서 세다. (C)형광의 정량화를 위해 컴포컬 현미경의 z-stack 모드로 근육의 층을 일정한 간격으로 촬영하였다. 그런 다음 ImageJ 소프트웨어를 활용하여 단면들의 형광 세기를 합치고 평균 세기를 구하였다. 대조군 초파리는 DHE가 나타내는 형광의 세기, 즉 ROS의 양의 개체 사이에서 비교적 일정하였다. 반면 *Psd* 유전자 돌연변이 초파리 개체들 사이의 형광 세기에는 차이가 있었다. 하지만 평균 값의 증가는 돌연변이 초파리에서 ROS가 더욱 많이 발생한다는 것을 말해준다(** $P < 0.01$, student's t-test). Scale bar=100um. 오차막대는 표준오차를 의미한다.

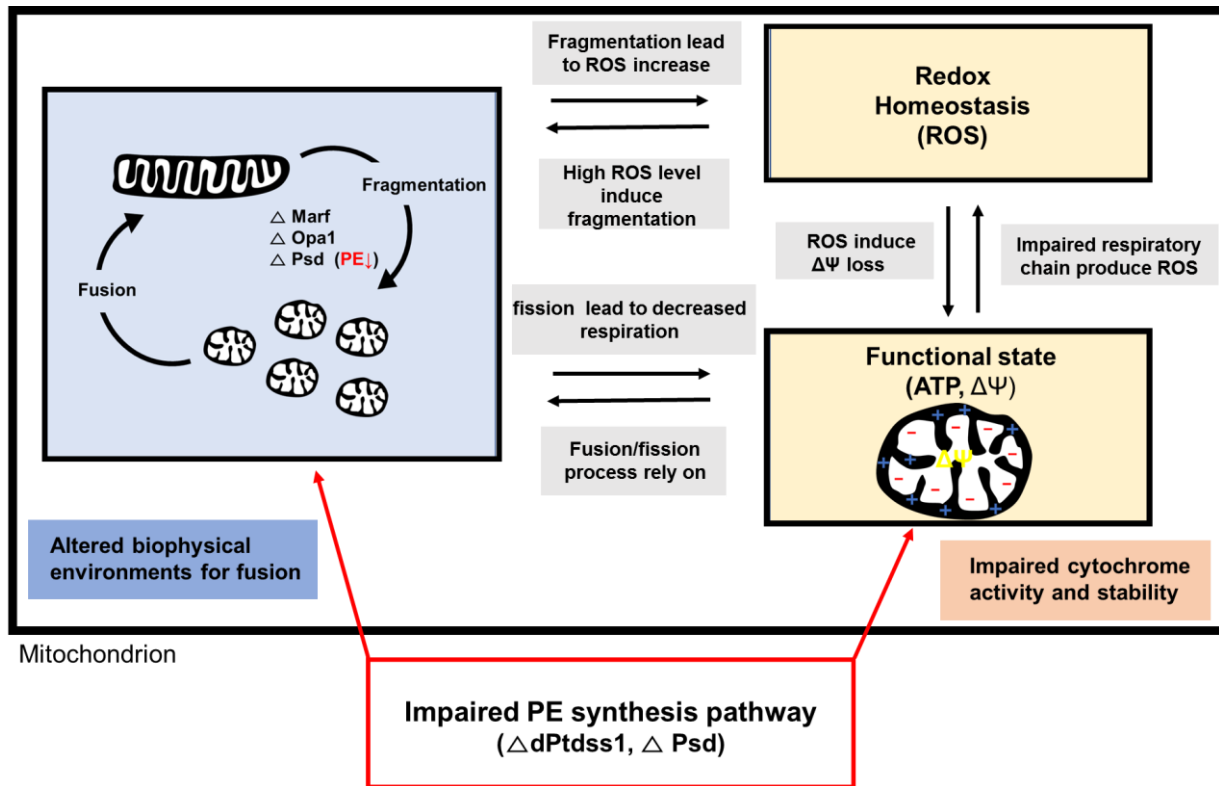


그림 12. 미토콘드리아의 형태 및 기능에 대한 PE 합성 경로의 영향을 보여주는 모식도

모식도는 미토콘드리아 형태와 기능에 대한 *Psd* 유전자 돌연변이의 영향을 보여준다. 미토콘드리아 형태, 기능 상태 및

ROS의 발생은 서로 연관되어 있다. 미토콘드리아의 분절화(fragmentation)는 미토콘드리아의 막 전위의 감소와 ATP합성의 저하를 야기하며, 반대로 미토콘드리아의 기능 장애는 미토콘드리아가 융합, 분열하는데 필요한 ATP를 공급하지 못하게 만들어 미토콘드리아의 역동(dynamics)를 저해한다. 미토콘드리아의 기능 저하에 따른 산화적 인산화의 결핍은 ROS 발생을 억제하기도 하며 반대로 촉진하기도 한다. 많은 양의 ROS는 미토콘드리아의 핵산, 단백질, 지질 등을 과산화시켜 결국 미토콘드리아에 유해하게 작용하기도 한다. 마지막으로 ROS의 증가는 세포의 산화스트레스 증가로 작용하여 미토콘드리아가 분열되는 양상이 관찰된다. 반대로 분열된 미토콘드리아가 늘어날수록 ROS발생이 증가한다는 연구 결과가 존재한다. 미토콘드리아 막의 PE결핍은 미토콘드리아가 잘 융합하지 못하게 하며, 내막의 전자전달계 효소 활성을 저해한다. 따라서 PE는 미토콘드리아의 형태와 기능 유지에 중요한 인지질이다.

제4장 고 찰

선행 연구에서 인지질 합성의 이상과 신경 퇴행의 인과적 관계를 밝히고자 하였다. PS라는 인지질을 합성하는 *dPtdss1* 유전자의 돌연변이는 신경퇴행 표현형을 보이는데, 그 중에서도 미토콘드리아의 이상으로 여겨지는 ROS의 발생과 전자현미경 상에서 관찰된 구조의 이상에 주목하였다. 즉 *dPtdss1* 돌연변이 초파리는 미토콘드리아에 이상이 있을 것이라는 예상을 할 수 있었다. *dPtdss1*과 미토콘드리아 사이를 연결시켜주는 요인은 PE 합성경로이다. 미토콘드리아는 PE합성경로에 의존하여 미토콘드리아 막의 많은 부분을 차지하는 PE를 얻게되고, *dPtdss1*은 PE합성 경로에 전구체를 제공하는 중요한 역할을 한다. PE가 다른 세포 소기관과는 달리 미토콘드리아의 막에 풍부하게 존재한다는 점 (van Meer & de Kroon, 2011), 소포체에서 PE합성 경로가 존재함에도 불구하고, 미토콘드리아는 서로 다른 PE를 합성하는 여분의 PE합성 경로(PS decarboxylation)를 갖는다는 점과 PE합성의 대부분을 PS decarboxylation 경로에 의지한다(Kainu, et al.,2013)는 점은 연구의 대상을 PE합성 효소인 Psd와 미토콘드리아로 결정하게 하였다. 이렇듯 *dPtdss1* 유전자의 표현형 관찰에서 시작된 연구는 신경퇴행의 기작을 미토콘드리아의 이상으로 선정하게 하였고, *dPtdss1* 이후에 PE 합성과정에 참여하는 *Psd* 유전자의 역할 규명을 필요로 하게 되었다. 또한 PE가 갖는 독특한 구조는 이 인지질의 기능을 미토콘드리아의 형태 조절에 관하여 접근하게 하였다.

퇴행성 신경 질환은 그 기작과 증상이 매우 다양하지만, 많은 퇴행성 신경 질환에서 병의 진행함에 따라 인지질 조성의 뇌 조직에서 달라진다는 수 많은 사례들이 존재한다. 이는 인지질 조성의 변화가 발병의 원인일수도 있고, 반대로 신경 퇴행이 인지질 조성에 영향을 준

것일수도 있지만, 확실한 것은 신경퇴행과 인지질 조성은 매우 깊은 관련을 보인다는 것이다. 나는 이번 연구가 인지질 조성과 인지질을 합성하는 유전자와 신경퇴행질환의 발병 사이의 간극을 메꿔주는 역할을 할 수 있을 것이라고 생각한다. 즉 미토콘드리아 인지질의 변화는 미토콘드리아의 구조와 기능에 영향을 주어서, 결과적으로 신경 퇴행을 일으키는 요인이 될 수 있다는 것이다.

본 연구는 Psd의 기능이 미토콘드리아 막 융합에 필수적임을 보여준다. Psd가 합성하는 PE는 원뿔 모양의 독특한 특성으로 인해 막 환경에 음의 곡률을 부여하여 막 융합에 필요한 활성화 에너지를 낮출 뿐만 아니라(Osman et al., 2011), 세포막의 융합 과정에서 관찰되는 'hexagonal phase'를 형성한다. 즉 PE는 막 융합을 위한 생물 물리학적 환경을 막에 부여하는 것으로 보인다(Siegel & Epand, 1997; Jouhet, 2013). 막의 융합 과정에서 필요한 PE의 중요성은 미토콘드리아 막에 특히나 많은 PE가 존재하는 것을 설명해준다.

유전자의 기능을 분석하는 좋은 방법으로 돌연변이의 표현형이 유사한 다른 유전자와 비교하고 그 유전자의 기능으로부터 연구하고자 하는 유전자의 기능을 유추해보는 것이다. Psd유전자 돌연변이의 미토콘드리아의 형태는 mitochondrial assembly regulatory factor(*Marf*) 유전자 돌연변이 표현형과 유사하다 (Scholtes et al., 2018)(표1). *Marf* 유전자는 미토콘드리아 외막을 기계적으로 묶고 융합을 매개하는 다이나민 계열 GTPase를 암호화한다. 두 유전자의 표현형이 유사하다는 사실은 두 유전자가 상호작용을 하거나 어느 한 메커니즘 상에서 기능을 한다고 유추하게끔 하였다. 그리고 *Marf*가 암호화하는 mitofusin 단백질은 미토콘드리아 외막에 끼어들어가기 때문에 외막에 풍부하게 존재하는 PE(미토콘드리아의 외막 인지질

중에서 30%)(Horvath & Daum, 2013)는 이 Mitofusin 단백질이 기능하는데 영향을 줄 것이다.

Marf와 opa1 돌연변이는 모두 미토콘드리아가 분절화되어 길이가 줄어든다 (Deng et al., 2008). 그러나 둘의 지름은 다른 양상을 보인다. Marf 돌연변이는 미토콘드리아의 지름이 감소하여 전체 매트릭스의 면적이 줄어들고 원 모양을 띠게 되지만, Opa1의 돌연변이 미토콘드리아의 지름이 감소하지 않는다(Altanbyek et al., 2016). 이러한 점에서 *Psds*의 근육 특이적인 낙다운 돌연변이의 미토콘드리아는 Marf 돌연변이의 미토콘드리아 모양과 닮았다.

또한 실험적으로, Marf 돌연변이는 미토콘드리아의 항체 염색이 아주 명확하게 된다(Deng et al., 2008). 내막 융합 단백질 인 opa1의 돌연변이는 염색된 미토콘드리아의 경계가 명확하지 않지만, Marf 돌연변이는 미토콘드리아가 염색될 때 명확한 경계를 갖는다(Deng et al., 2008). 이러한 실험적 사례는 본 실험의 결과와 일치한다 (*Psds* 돌연변이의 미토콘드리아의 경계는 선명하고 명확하다).

Marf 유전자가 암호화하는 Mitofusin2 단백질은 미토콘드리아와 소포체를 엮어서 물질의 이동을 용이하게 하며, PE의 전구체인 PS의 미토콘드리아로의 운반에 관여한다는 사실(Brito & Scorrano et al., 2014)은 PE가 융합 과정에서 필요하다는 것을 암시하며 나아가 mitofusin과 PE가 미토콘드리아 막의 융합 과정에서 상호작용을 할 수 있음을 제시한다. 이 상호작용에 대해 생각해본다면, Mfn1/2는 미토콘드리아 인지질 막에 삽입되어 있는 효소이며(Rajo et al., 2002) 따라서 효소 활성화는 막 인지질 성분의 영향을 받을 것으로 기대된다 (Lee, 2003). 따라서 *Psds* 유전자 돌연변이에 의해 야기된 미토콘드리아 막의 PE 구성의 변화는 융합 단백질, mitofusin1/2의 활성화 또는

막으로의 끼어들어감 (spanning)에 영향을 미쳐 미토콘드리아의 융합의 정도와 기능을 결정할 수 있을 것이다.

이전 연구에 따르면, PE는 미토콘드리아의 구조뿐만 아니라 기능에도 직접적인 영향을 미칠 수 있다 (그림 12). PE와 전자전달계 활성의 관계에 대한 많은 연구들이 진행되었다. 전자전달계 효소인 시토크롬은 산화적 인산화 과정에 필요한 전자를 운반하며, 이 과정이 일어나는 장소인 미토콘드리아 내막에 위치한다. PE는 사이토크롬 c 산화 효소 (IV) 활성화에 필수적이며 PE의 결핍은 효모에서 시토크롬 c의 기능 장애를 일으킨다 (Buttinger et al., 2012). 또 다른 연구에서도 마찬가지로, *Psd*에 의한 합성되어 미토콘드리아 내막으로 이동한 PE는 cytochrome bc1 (III) 활성화와 안정성에 필수적이라고 연구된 바 있다 (Calzada et al., 2019). 시토크롬은 산화적 인산화를 수행하는 효소이다. PE는 막의 융합 과정에서 중요할 뿐만 아니라, 막의 부피에도 영향을 주어 막 단백질의 삽입(insertion), 접힘(folding) 등에도 영향을 준다 (Basu Ball et al., 2018). 따라서 PE는 미토콘드리아의 내막에 존재하는 사이토크롬이 기능을 할 수 있는 막 환경을 제공해주는데, PE 합성 유전자의 돌연변이는 사이토크롬의 활성화에 영향을 주는 막 환경의 변화를 야기할 것이라고 예상할 수 있다. 따라서 PE 결핍에 의한 cytochrome의 불안정성은 ROS 생성, 막 전위 손실, ATP 합성 문제 (Macchi et al., 2013; Amo et al., 2011; Bottinger et al., 2012)로 이어질 수 있다. 즉, *Psd*의 손실로 인한 PE의 결핍은 구조적 및 기능적 이상을 모두 직접적으로 일으킬 수 있다(그림 11).

본 연구에서는 *Psd* 유전자의 기능손실이 미토콘드리아 구조와 기능에 이상에 따른 ROS의 발생 그리고 신경 퇴행을 초래함을 확인하였다. 결론적으로, *Psd* 유전자의 기능은 미토콘드리아

homeostasis와 신경계 유지에 중요하다고 할 수 있다. 본 연구를 통해 *Psd*를 포함한 인지질 합성 유전자의 기능 이상은 미토콘드리아 구조와 기능에 영향을 미쳐 미토콘드리아와 관련된 여러 질환을 일으킬 수 있음을 제안한다.

참고문헌

- Amo, T., Sato, S., Saiki, S., Wolf, A. M., Toyomizu, M., Gautier, C. A., . . . Hattori, N. (2011). Mitochondrial membrane potential decrease caused by loss of PINK1 is not due to proton leak, but to respiratory chain defects. *Neurobiology of Disease*, 41(1), 111–118.
- Au – Sunderhaus, E. R., & Au – Kretzschmar, D. (2016). Mass Histology to Quantify Neurodegeneration in Drosophila. *JoVE*(118), e54809.
- Basu Ball, W., Neff, J., & Gohil, V. (2017). *The role of non-bilayer phospholipids in mitochondrial structure and function* (Vol. 592).
- Basu Ball, W., Neff, J. K., & Gohil, V. M. (2018). The role of nonbilayer phospholipids in mitochondrial structure and function. *FEBS letters*, 592(8), 1273–1290.
- Beal, M. F. (2005). Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Annals of Neurology*, 58(4), 495–505.
- Bertholet, A. M., Delerue, T., Millet, A. M., Moulis, M. F., David, C., Daloyau, M., . . . Belenguer, P. (2016). Mitochondrial fusion/fission dynamics in neurodegeneration and neuronal plasticity. *Neurobiology of Disease*, 90, 3–19.
- Bleijerveld, O. B., Brouwers, J., Vaandrager, A. B., Helms, J. B., & Houweling, M. (2007). The CDP-ethanolamine pathway and phosphatidylserine decarboxylation generate different phosphatidylethanolamine molecular species. *Journal of Biological Chemistry*, 282(39), 28362–28372.
- Bosetti, F., Brizzi, F., Barogi, S., Mancuso, M., Siciliano, G., Tendi, E. A., . . . Solaini, G. (2002). Cytochrome c oxidase and mitochondrial F1F0-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer' s disease. *Neurobiology of Aging*, 23(3), 371–376.
- Böttinger, L., Horvath, S. E., Kleinschroth, T., Hunte, C., Daum, G., Pfanner, N., & Becker, T. (2012). Phosphatidylethanolamine and cardiolipin differentially affect the stability of mitochondrial respiratory chain supercomplexes. *Journal of molecular biology*, 423(5), 677–686.

- Chen, H. C., Chomyn, A., & Chan, D. C. (2005). Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *Journal of Biological Chemistry*, 280(28), 26185–26192.
- Chen, H. C., Vermulst, M., Wang, Y. E., Chomyn, A., Prolla, T. A., McCaffery, J. M., & Chan, D. C. (2010). Mitochondrial Fusion Is Required for mtDNA Stability in Skeletal Muscle and Tolerance of mtDNA Mutations. *Cell*, 141(2), 280–289.
- Deng, H., Dodson, M. W., Huang, H., & Guo, M. (2008). The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(38), 14503–14508.
- Flis, V. V., & Daum, G. Lipid transport between the endoplasmic reticulum and mitochondria. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(6), a013235.
- Frohman, M. A. (2015). Role of mitochondrial lipids in guiding fission and fusion. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 93(3), 263–269.
- Harayama, T., & Riezman, H. (2018). Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19, 281.
- Horvath, S. E., & Daum, G. (2013). Lipids of mitochondria. *Progress in Lipid Research*, 52(4), 590–614.
- Johri, A., & Beal, M. F. (2012). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 342(3), 619–630.
- Johri, A., Calingasan, N. Y., Hennessey, T. M., Sharma, A., Yang, L., Wille, E., . . . Beal, M. F. (2012). Pharmacologic activation of mitochondrial biogenesis exerts widespread beneficial effects in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Human molecular genetics*, 21(5), 1124–1137.
- Jouhet, J. (2013). Importance of the hexagonal lipid phase in biological membrane organization. *Frontiers in plant science*, 4, 494–494.
- Kainu, V., Hermansson, M., Hänninen, S., Hokynar, K., & Somerharju, P. (2013). Import of phosphatidylserine to and export of phosphatidylethanolamine molecular species from

- mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(2), 429–437.
- Kim, J., Moody, J. P., Edgerly, C. K., Bordiuk, O. L., Cormier, K., Smith, K., . . . Ferrante, R. J. (2010). Mitochondrial loss, dysfunction and altered dynamics in Huntington's disease. *Human molecular genetics*, 19(20), 3919–3935.
- Kim, G. H., Kim, J. E., Rhie, S. J., & Yoon, S. (2015). The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Experimental neurobiology*, 24(4), 325–340.
- Kosicek, M., & Hecimovic, S. (2013). Phospholipids and Alzheimer's disease: alterations, mechanisms and potential biomarkers. *International journal of molecular sciences*, 14(1), 1310–1322.
- Lezi, E., & Swerdlow, R. H. (2012). Mitochondria in neurodegeneration. *Advances in experimental medicine and biology*, 942, 269–286.
- Liu, Z., Ren, Z., Zhang, J., Chuang, C.–C., Kandaswamy, E., Zhou, T., & Zuo, L. (2018). Role of ROS and Nutritional Antioxidants in Human Diseases. *Frontiers in physiology*, 9, 477–477.
- Li, Z., Zhang, J., & Sun, H. (2015). Increased plasma levels of phospholipid in Parkinson's disease with mild cognitive impairment. *Journal of Clinical Neuroscience*, 22(8), 1268–1271.
- Macchi, M., El Fissi, N., Tufi, R., Bentobji, M., Liévens, J.–C., Martins, L. M., . . . Rival, T. (2013). The drosophila inner-membrane protein PMI controls crista biogenesis and mitochondrial diameter. *Journal of Cell Science*, 126(3), 814.
- McGurk, L., Berson, A., & Bonini, N. M. (2015). Drosophila as an In Vivo Model for Human Neurodegenerative Disease. *Genetics*, 201(2), 377–402.
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal*, 417(1), 1–13.
- Nakada, K., Inoue, K., Ono, T., Isobe, K., Ogura, A., Goto, Y., . . . Hayashi, J. I. (2001). Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nature Medicine*, 7(8), 934–940.
- Narendra, D. P., & Youle, R. J. (2011). Targeting mitochondrial

- dysfunction: role for PINK1 and Parkin in mitochondrial quality control. *Antioxidants & redox signaling*, 14(10), 1929–1938.
- Osman, C., Voelker, D. R., & Langer, T. (2011). Making heads or tails of phospholipids in mitochondria. *The Journal of cell biology*, 192(1), 7–16.
- Picard, M., Taivassalo, T., Ritchie, D., Wright, K. J., Thomas, M. M., Romestaing, C., & Hepple, R. T. (2011). Mitochondrial structure and function are disrupted by standard isolation methods. *PloS one*, 6(3), e18317–e18317.
- Rai, M., Katti, P., & Nongthomba, U. (2014). Drosophila Erect wing (Ewg) controls mitochondrial fusion during muscle growth and maintenance by regulation of the Opa1-like gene. *Journal of Cell Science*, 127(1), 191.
- Scholtes, C., Bellemin, S., Martin, E., Carre-Pierrat, M., Mollereau, B., Gieseler, K., & Walter, L. (2018). DRP-1-mediated apoptosis induces muscle degeneration in dystrophin mutants. *Scientific reports*, 8(1), 7354–7354.
- Schuiki, I., & Daum, G. (2009). Phosphatidylserine decarboxylases, key enzymes of lipid metabolism. *IUBMB Life*, 61(2), 151–162.
- Skulachev, V. P. (2001). Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(1), 23–29.
- Sunderhaus, E. R., & Kretzschmar, D. (2016). Mass Histology to Quantify Neurodegeneration in Drosophila. *Journal of visualized experiments : JoVE*(118), 54809.
- van Meer, G., & de Kroon, A. I. P. M. (2011). Lipid map of the mammalian cell. *Journal of Cell Science*, 124(1), 5.
- Tzameli, I. (2012). The evolving role of mitochondria in metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(9), 417–419.
- Wang, Z.-H., Clark, C., & Geisbrecht, E. R. (2016). Drosophila clueless is involved in Parkin-dependent mitophagy by promoting VCP-mediated Marf degradation. *Human molecular genetics*, 25(10), 1946–1964.
- Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(12), 872–884.
- Willems, Peter H. G. M., Rossignol, R., Dieteren, Cindy E. J., Murphy,

- Michael P., & Koopman, Werner J. H. (2015). Redox Homeostasis and Mitochondrial Dynamics. *Cell Metabolism*, 22(2), 207–218.
- Yang, J., Kim, M. J., Yoon, W., Kim, E. Y., Kim, H., Lee, Y., . . . Koh, H. (2017). Isocitrate protects DJ-1 null dopaminergic cells from oxidative stress through NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase (IDH). *PLOS Genetics*, 13(8), e1006975.
- Yoon, W., Hwang, S.-H., Lee, S.-H., & Chung, J. (2019). Drosophila ADCK1 is critical for maintaining mitochondrial structures and functions in the muscle. *PLOS Genetics*, 15(5), e1008184.
- Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., . . . Zorov, D. B. (2018). Mitochondrial membrane potential. *Analytical biochemistry*, 552, 50–59.
- 조민규. (2014). 초파리 CG4825 돌연변이가 수명과 신경퇴화에 미치는 영향. 석사학위논문, 서울대학교, 서울
- 이미화. (2018). 초파리 Ptdss1 유전자의 기능 획득 돌연변이에 대한 분석. 석사학위논문, 서울대학교, 서울
- 박예진. (2018). 초파리의 dPtdss1 유전자 돌연변이에 의한 교세포 기능 이상 연구. 석사학위논문, 서울대학교, 서울

Abstract

Mitochondrial Fragmentation and Abnormal function of *Drosophila* Phosphatidylserine Decarboxylase Gene Mutation

Lee Gye Hun

Department of Science Education, Biology Major

The Graduate School

Seoul National University

Dysfunction of the mitochondria and subsequent development of ROS is one of the causes of degenerative neurological diseases. Mitochondria constantly fuse and divide to meet the needs of cells and to perform and maintain functions in the physiological environment. Proteins that regulate mitochondrial fusion and fission are highly conserved among many species. Recently, it has been found that not only proteins but also phospholipids constituting the mitochondrial membrane also affect the process of fusion and fission. Therefore, it is important to understand the relationship between

phospholipid synthesis genes, mitochondria, and neurodegenerative diseases by addressing the causes of neurodegenerative disorder due to mitochondrial disorders. We examined the mutant phenotype of phosphatidylserine decarboxylase (*Psdl*), a gene synthesizing mitochondrial membrane phosphatidylethanolamine (PE), at mitochondrial and organism levels. In this study, it was confirmed that Psd, the last enzyme of PE synthesis, is important for the fusion of mitochondria, the structure and function of mitochondria due to *Psdl* mutation, and the phenotype of degenerative neuropathy at the individual level.

Keywords: Mitochondria, Phosphatidylethanolamine

Phosphatidylserine decarboxylase (*Psdl*), membrane fusion.

Student Number: 2017–27741